

Université de Montréal

Régulation de la SUMOylation, de la phosphorylation et de l'ubiquitination en réponse au trioxyde d'arsenic

par Clémence Rinfret Robert

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M. Sc.)

en Biochimie

option Dynamique cellulaire des complexes macromoléculaires

Août 2019

© Clémence Rinfret Robert, 2019

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Régulation de la SUMOylation, de la phosphorylation et de l'ubiquitination en réponse au trioxyde d'arsenic

Présenté par

Clémence Rinfret Robert

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Marlene Oeffinger

Présidente-rapporteuse

Pierre Thibault

Directeur de recherche

Benoit Coulombe

Membre du jury

Résumé

La leucémie aiguë promyélocytaire (APL) est un cancer des globules blancs qui se caractérise par l'accumulation de granulocytes immatures appelés promyélocytes. Dans la majorité des cas, la maladie est causée par la translocation réciproque des gènes *RARα* et *PML*, menant à l'expression de la protéine de fusion *PML/RARα* qui compromet à la fois les fonctions assurées normalement par *RARα* et par *PML*. Ainsi, la répression de la transcription des gènes cibles de *RARα* et la perturbation de la formation des corps nucléaires *PML* seraient la cause de la non-différenciation et de la survie par inhibition de l'apoptose des promyélocytes. Un des agents thérapeutiques utilisés dans le traitement de la maladie est le trioxyde d'arsenic (ATO) et malgré le fait que son efficacité soit prouvée, les mécanismes moléculaires par lesquels il exerce son action ne sont pas entièrement caractérisés. *PML* étant SUMOylée en réponse à l'ATO, nous avons émis l'hypothèse que d'autres protéines pourraient être régulées dans leurs modifications post-traductionnelles (PTMs) en réponse à l'agent thérapeutique et pourraient occuper un rôle dans le processus de guérison. Une analyse par protéomique quantitative de cellules HEK293 traitées à l'ATO a permis d'identifier 92 protéines significativement régulées en SUMOylation, incluant certains substrats connus de la caspase-3. Suite à cette observation, nous avons supposé que la SUMOylation pourrait protéger les substrats de la caspase-3 de leur clivage protéolytique. À l'aide d'essais *in vitro* et d'immunobuvardages, nous avons confirmé que la SUMOylation de PARP1 empêche son clivage par la caspase-3, ce qui pourrait jouer un rôle dans le destin cellulaire.

Mots-clés : SUMOylation, phosphorylation, ubiquitination, trioxyde d'arsenic, leucémie aiguë promyélocytaire, *PML*, protéomique, spectrométrie de masse, apoptose, PARP1, caspase-3

Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a cancer of white blood cells characterized by the accumulation of immature granulocytes called promyelocytes. In most cases, the disease is caused by the reciprocal translocation of the RAR α and PML genes, leading to the expression of the PML/RAR α fusion protein that compromises both the functions normally provided by RAR α and by PML. Thus, repression of the transcription of RAR α target genes and disruption of the formation of PML nuclear bodies may cause the non-differentiation of promyelocytes and the promotion of their survival by inhibition of apoptosis. One of the therapeutic agents used to treat the disease is arsenic trioxide (ATO) and despite the fact that its effectiveness is proven, the molecular mechanisms through which it exerts its action are not fully characterized. Since PML is SUMOylated in response to ATO, it is likely that other proteins may also exhibit changes in their post-translational modifications (PTMs) and play a role in the response. By using large-scale proteomic workflows on HEK293 cells following ATO treatment, we identified 92 proteins that shown significant changes in SUMOylation, including some known capase-3 substrates. Following this observation, we surmised that SUMOylation may protect these substrates from caspase-3 cleavage. Using *in vitro* assays and immunoblots, we confirmed that SUMOylation of PARP1 prevents its cleavage by caspase-3, an event that could mediate cell fate.

Keywords : SUMOylation, phosphorylation, ubiquitylation, arsenic trioxide, acute promyelocytic leukemia, PML, proteomics, mass spectrometry, apoptosis, PARP1, caspase-3

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles.....	ix
Remerciements	xi
1. Introduction.....	1
1.1 Les modifications post-traductionnelles.....	1
1.2 La phosphorylation.....	1
1.3 L'ubiquitination	2
1.4 La SUMOylation	3
1.4.1 Les protéines SUMO.....	3
1.4.2 La conjugaison et la déconjugaison des protéines SUMO	3
1.4.3 La poly-SUMOylation et le motif d'interaction avec SUMO	5
1.4.4 Les fonctions la SUMOylation	5
1.5 Relations entre les modifications post-traductionnelles	5
1.6 La leucémie.....	6
1.7 La leucémie aiguë promyélocytaire.....	6
1.7.1 Manifestations cliniques et statistiques.....	6
1.7.2 Évolution des traitements.....	8
1.7.3 Bases moléculaires de la maladie	8
1.8 PML.....	9
1.8.1 Structure de la protéine	9
1.8.2 Corps nucléaires PML	10
1.8.3 Formation des corps nucléaires PML.....	11
1.9 RARα	12

1.10 La protéine de fusion PML/RARα	13
1.11 Le trioxyde d'arsenic	15
1.11.1 L'arsenic	15
1.11.2 Traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire	16
1.11.3 Régulation des enzymes	17
1.12 L'apoptose	18
1.13 Les caspases	19
1.14 PARP1	20
1.15 La protéomique basée sur la spectrométrie de masse	21
1.15.1 Approches en protéomique	21
1.15.2 Extraction des protéines	22
1.15.3 Séparation et purification des protéines	22
1.15.4 Digestion des protéines	22
1.15.5 Séparation et purification des peptides	23
1.15.6 Injection des peptides en spectrométrie de masse	23
2. Élaboration du projet de recherche	27
2.1 Problématique	27
2.2 Hypothèse de travail	27
2.3 Objectifs	28
2.3.1 Objectif général	28
2.3.2 Objectifs spécifiques	28
3. Matériel et méthodes	29
3.1 Culture cellulaire	29
3.2 Expérience de spectrométrie de masse à grande échelle	29
3.2.1 Récolte et lyse des cellules	29
3.2.2 Purification d'affinité au NiNTA	30
3.2.3 Préparation de billes couplées à l'anticorps anti-K(GG)	30
3.2.4 Préparation de billes couplées à l'anticorps anti-K(NQTGG)	31
3.2.5 Immunopurification des peptides SUMOylés et ubiquitylés	31
3.2.6 Fractionnement des peptides SUMOylés	32
3.2.7 Purification des peptides phosphorylés	32
3.2.8 Analyse par spectrométrie de masse	33

3.2.9 Traitement des données	33
3.3 Purification d'affinité au NiNTA	34
3.3.1 Cellules utilisées pour réaliser l'essai caspase.....	34
3.4.2 Cellules traitées à l'ATO	34
3.6 Essai caspase.....	34
3.6.1 Optimisation des conditions de l'essai caspase	34
3.6.2 Essai caspase sur les protéines SUMOylées	35
3.7 Immunobuvardage	36
4. Résultats	37
4.1 Optimisation des conditions pour le traitement des cellules	37
4.2 Aperçu de l'expérience de spectrométrie de masse	38
4.3 Sites et protéines identifiées par spectrométrie de masse	40
4.4 Analyse quantitative	41
4.5 Réseau d'interactions protéine-protéine.....	42
4.6 Poly-SUMOylation et poly-ubiquitination.....	45
4.7 Analyse d'ontologie génique.....	47
4.8 Relations entre les modifications post-traductionnelles	48
4.9 SUMOylation de PARP1	51
4.10 Clivage protéolytique de PARP1 en réponse à l'ATO	54
4.11 Développement d'un essai caspase	55
4.12 Optimisation des conditions pour l'essai caspase	57
4.13 Effet de la SUMOylation sur le clivage de PARP1 <i>in vitro</i>	59
4.14 Vérification des conditions pour l'essai caspase	59
4.15 Modèle proposé.....	62
5. Discussion	64
6. Conclusion et perspectives	69
Bibliographie	71
Annexes	84
Colorations au rouge de Ponceau	84
Sites significativement régulés.....	86

Liste des tableaux

Tableau I. Sites SUMOylés significativement régulés en réponse à 1 μ M d'ATO	86
Tableau II. Sites phosphorylés significativement régulés en réponse à 1 μ M d'ATO.....	86
Tableau III. Sites ubiquitylés significativement régulés en réponse à 1 μ M d'ATO	86
Tableau IV. Sites SUMOylés significativement régulés en réponse à 10 μ M d'ATO.....	87
Tableau V. Sites phosphorylés significativement régulés en réponse à 10 μ M d'ATO.....	91
Tableau VI. Sites ubiquitylés significativement régulés en réponse à 10 μ M d'ATO.....	92

Liste des figures

Figure 1. Conjugaison et dé-conjugaison des protéines SUMO.....	4
Figure 2. Représentation de l'hématopoïèse	7
Figure 3. Structure de PML/RAR α	9
Figure 4. Structure des isoformes de PML	10
Figure 5. Modèle de formation des corps nucléaires PML	12
Figure 6. Signalisation de PML/RAR α	15
Figure 7. Dégradation de PML/RAR α	17
Figure 8. Représentation des mécanismes régulant l'apoptose	19
Figure 9. Représentation de l'activité catalytique de PARP	21
Figure 10. Représentation d'une expérience classique en protéomique.....	26
Figure 11. Détermination des conditions optimales pour l'expérience de spectrométrie de masse à grande échelle	38
Figure 12. Aperçu de la stratégie utilisée pour enrichir et analyser les peptides SUMOylés, phosphorylés et ubiquitylés	39
Figure 13. Nombre de protéines et de sites identifiés dans chacun des trois réplicats biologiques en réponse à 1 uM et 10 uM d'ATO	40
Figure 14. Analyse quantitative de la régulation de la SUMOylation, de la phosphorylation et de l'ubiquitination en réponse à l'ATO	42
Figure 15. Les protéines avec un site SUMOylé, phosphorylé ou ubiquitylé régulé de manière significative montrent un degré élevé d'interconnectivité	44
Figure 16. Sites de SUMOylation et d'ubiquitination significativement régulés identifiés sur SUMO1, SUMO2, SUMO3 et sur l'ubiquitine	46
Figure 17. Les protéines avec un site SUMOylé, phosphorylé ou ubiquitylé significativement régulé sont impliquées dans la réparation de l'ADN	48
Figure 18. Chevauchement des protéines portant un site de SUMOylation, de phosphorylation ou d'ubiquitination	49
Figure 19. Relations entre les modifications post-traductionnelles sur quelques protéines d'intérêt.....	51

Figure 20. SUMOylation de PARP1 en réponse à l'ATO.....	53
Figure 21. PARP1 est clivée en réponse à l'ATO à partir de 48h de traitement.....	55
Figure 22. Aperçu de la stratégie utilisée afin d'étudier le rôle de la SUMOylation par rapport au clivage par la caspase-3	56
Figure 23. Détermination des conditions optimales pour l'essai caspase	58
Figure 24. La SUMOylation protège PARP1 contre son clivage protéolytique <i>in vitro</i>	59
Figure 25. Vérification des conditions de l'essai caspase	61
Figure 26. Modèle proposé pour le rôle de la SUMOylation de PARP1 par rapport à son clivage protéolytique par la caspase-3 dans le contexte du traitement à l'ATO	63
Figure 27. Coloration au rouge de Ponceau pour les immunobuvardages servant à déterminer les conditions optimales pour l'expérience de spectrométrie de masse à grande échelle	84
Figure 28. Coloration au rouge de Ponceau pour l'immunobuvardage correspondant à la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M d'ATO	84
Figure 29. Coloration au rouge de Ponceau pour l'immunobuvardage correspondant à la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h.....	85

Liste des sigles

Ac	Groupelement acétyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATO	Trioxyde d'arsenic (arsenic trioxide)
ATP	Adénosine triphosphate
ATR α	Acide tout-trans rétinoïque (all-trans retinoic acid)
BRCT	Domaine en C-terminal de BRCA1 (BRCA1 C-terminal domain)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CID	Dissociation induite par collision (collision induced dissociation)
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMP	Pimélimidate de diméthyle (dimethyl pimelimidate)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
DUB	Enzyme de débiquitination (deubiquitylating enzyme)
ECL	Chimioluminescence améliorée (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
ESI	Nébulisation électrostatique (electrospray ionisation)
ETD	Dissociation par transfert d'électrons (electron transfer dissociation)
FBS	Sérum de veau fœtal (fetal bovine serum)
GO	Ontologie génique (gene ontology)
HCD	Dissociation par collision à haute énergie (higher energy collisional dissociation)
HEK	Rein embryonnaire humain (human embryonic kidney)
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HRP	Peroxydase de raifort (horseradish peroxidase)
IP	Immunopurification
LAM	Leucémie aiguë myéloblastique
LAP	Leucémie aiguë promyélocytaire
LC	Chromatographie liquide (liquid chromatography)

MALDI	Désorption/ionisation au laser assistée par matrice (matrix assisted laser desorption/ ionisation)
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MS	Spectrométrie de masse (mass spectrometry)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (tandem mass spectrometry)
NB	Corps nucléaire (nuclear body)
NES	Signal d'exportation nucléaire (nuclear export signal)
NLS	Signal de localisation nucléaire (nuclear localisation signal)
NTA	Acide nitrilotriacétique (nitrilotriacetic acid)
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
pNA	p-Nitroallinine
PTM	Modification post-traductionnelle (post-translational modification)
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE	Élément de réponse à l'acide rétinoïque (retinoic acid response element)
ROS	Dérivé réactif de l'oxygène (reactive oxygen specie)
SCX	Échange de cations (strong cation exchange)
SDS	Dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate)
SEN	Protéases spécifiques à SUMO (SUMO-specific protease)
SILAC	Marquage avec des acides aminés contenant des isotopes stables en culture cellulaire (stable isotope labeling with amino acids in cell culture)
SIM	Motif d'interaction avec SUMO (SUMO interaction motif)
STUbL	Ligase de l'ubiquitine ciblant SUMO (SUMO-targeted ubiquitin ligases)
SUMO	Petit modificateur apparenté à l'ubiquitine (small ubiquitin-related modifier)
TBST	Solution saline tamponnée au TRIS avec du tween (TRIS-buffered saline with tween)
TFA	Acide trifluoroacétique (trifluoroacetic acid)
TRIM	Motif tripartite (tripartite motif)
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UBD	Domaine de liaison à l'ubiquitine (ubiquitin-binding domain)
UBL	Modificateur apparenté à l'ubiquitine (ubiquitin-related modifier)
UTR	Région non traduite (untranslated region)

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le professeur Pierre Thibault, qui m'a donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise au sein de son équipe et qui a su me communiquer sa passion pour la protéomique. Merci pour la confiance, les conseils, le soutien et les nombreuses connaissances que j'ai pu acquérir au cours de mon passage dans le laboratoire. Faire mes études graduées avec un chercheur d'un tel calibre et sur un sujet aussi intéressant a été pour moi un véritable honneur.

Merci à tous les membres du laboratoire et particulièrement à Francis McManus qui m'a accompagnée tout au long de mon projet. Merci pour ton écoute, ta patience, tes idées, tes réponses à mes interrogations et ton sens de l'humour. Je n'aurais pas pu avoir un meilleur mentor. Je remercie également Frédéric Lamoliatte, qui m'a d'abord initiée au projet et au monde de la recherche. Un merci tout spécial à mes collègues de laboratoire qui sont devenus des amis précieux et avec qui chaque moment passé au chalet, en camping ou ailleurs est mémorable. Danke Sibylle, thanks Trent et merci Simon, sans vous, ces deux dernières années n'auraient pas été les mêmes. Merci également à Chongyang, un partenaire d'exception pour les conférences et pour la natation. À Jenna, ma voisine de bureau préférée, à Charles pour les photos souvenirs, à Cédric pour son enthousiasme et à Mirela pour sa bonne humeur, merci.

Un merci infini à la meilleure des familles pour le support sans limites, ma mère Brigitte, ma plus grande confidente, mon père Louis André avec qui je discute pendant des heures et mon frère Louis-Antoine qui a le don comme personne de me faire rire. Je remercie également mes amis qui m'ont soutenue, écoutée, parfois réconfortée et avec qui les moments de folie sont inévitables, mon meilleur ami Joseph ainsi que Jean-Samuel, Gabriel, Isabelle, Sarah, Danaé, François, Cassandra, Sabrina et Stéphanie.

Merci finalement aux membres du jury qui ont généreusement accepté de corriger ce mémoire.

1. Introduction

1.1 Les modifications post-traductionnelles

Le nombre de gènes codés par le génome humain est maintenant évalué à aussi peu que 20 000, mais la diversité du protéome est nettement plus importante en raison de l'épissage alternatif et des modifications qui ont lieu sur les protéines suite à leur traduction lesquelles peuvent moduler leur localisation, leurs fonctions ou leurs interactions protéine-protéine (1, 2). Ces modifications post-traductionnelles (PTMs), qu'elles soient de natures chimique ou protéique, soulèvent un intérêt certain en recherche puisqu'elles peuvent, par exemple, être essentielles à la survie d'un organisme ou encore parce qu'elles sont impliquées dans le développement de maladies. À ce jour, plus de 200 modifications post-traductionnelles différentes ont été identifiées (3).

1.2 La phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle de nature chimique qui consiste en l'ajout d'une molécule de phosphate sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine d'une protéine cible. La conjugaison du phosphate est catalysée par des protéines kinases et la dé-phosphorylation est assurée par des protéines phosphatases. La première observation d'une activité kinase remonte au milieu des années 1950 et la phosphorylation est aujourd'hui une des modifications post-traductionnelles les mieux caractérisées (4). Un nombre impressionnant de protéines est modifié par phosphorylation et de multiples fonctions sont associées à cette modification, la plus connue étant la régulation de l'activité enzymatique (5). Il n'est probablement pas exagéré de dire que la phosphorylation touche l'ensemble des processus cellulaires de façon directe ou indirecte, les protéines kinases et phosphatases représentant près de 2 à 5 % du génome humain (6, 7). La modification occupe également un rôle important dans la croissance, la différenciation et la signalisation cellulaire et est impliquée dans le développement de maladies, particulièrement le cancer (8). Certaines thérapies prometteuses dans le traitement du cancer ciblent d'ailleurs la phosphorylation (9).

1.3 L'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle de nature protéique qui se définit par la liaison covalente de l'ubiquitine sur une lysine d'une protéine cible. L'ubiquitine, membre fondateur des UBLs (ubiquitin-related modifiers), est une petite protéine de 76 acides aminés, caractérisée depuis le milieu des années 1970 (10), qui se trouve en quantité abondante dans plusieurs compartiments cellulaires. Quatre gènes différents permettent la synthèse de l'ubiquitine, soit RPS27A, UBA52, UBB et UBC. Une copie unique de l'ubiquitine fusionnée à la protéine ribosomale R27a est codée par le gène RPS27a (11) et une autre copie fusionnée à la protéine ribosomale L40 est codée par le gène UBA52 (12). Les gènes UBB et UBC, quant à eux, codent pour un précurseur contenant plusieurs copies d'ubiquitine (13). Le nombre de répétitions diffère, entre autres, d'une espèce à l'autre. Les enzymes permettant de cliver ces polymères d'ubiquitine sont appelées DUBs (deubiquitylating enzymes). Comme leur nom l'indique, ces enzymes sont également responsables de la dé-ubiquitination (14). La conjugaison de l'ubiquitine sur une protéine cible se déroule en trois étapes enzymatiques. Une première enzyme E1 permet l'activation de l'ubiquitine via l'utilisation d'une molécule d'ATP et la formation d'un lien thioester riche énergétiquement. Ensuite, l'ubiquitine est transférée de E1 à une cystéine du site actif d'une enzyme E2. Finalement, l'ubiquitine est conjuguée à la lysine de son substrat directement par E2 ou via l'intermédiaire d'une enzyme E3 (15). À ce jour, deux E1, une cinquantaine de E2 et des centaines de E3 ont été identifiées chez l'humain pour l'ubiquitine (16). Les lysines des protéines cibles peuvent être mono-ubiquitylées ou poly-ubiquitylées. Ces deux phénomènes semblent occuper des rôles distincts dans la cellule. De plus, l'ubiquitine peut être modifiée par d'autres UBLs, comme SUMO (small ubiquitin-related modifier) et NEDD8 (neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8), menant à la modification de certains substrats par une chaîne mixte d'UBLs. Une classe de motifs nommée UBDs (ubiquitin-binding domains) permet à des adaptateurs d'interagir avec l'ubiquitine (17). La fonction cellulaire la plus associée à l'ubiquitination est l'assignation des protéines pour leur dégradation par le protéasome. Il est maintenant convenu que d'autres rôles sont associés à l'ubiquitination tels que la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN, la modification des histones et l'endocytose (18). L'ubiquitination semble également être

impliquée dans l'autophagie, un système protéolytique différent de celui médié par le protéasome (19).

1.4 La SUMOylation

1.4.1 Les protéines SUMO

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle de nature protéique, caractérisée pour la première fois il y a un peu plus de 20 ans (20), qui se traduit par la conjugaison d'une protéine SUMO sur une lysine d'une protéine cible. Les protéines SUMO font partie de la famille des UBLs et sont retrouvées chez l'ensemble des eucaryotes. Chez l'humain, quatre paralogues de SUMO ont été identifiés, soit SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 et SUMO-4. Sous leur forme mature, les séquences protéiques de SUMO-2 et de SUMO-3 ne diffèrent que par trois acides aminés, alors que SUMO-2/3 et SUMO-1 ne partagent que 45 % de leur séquence en acides aminés, bien que présentant une importante homologie dans leur structure tridimensionnelle (21). Le plus récent paralogue à avoir été identifié et le moins bien caractérisé est SUMO-4. Contrairement aux formes 1, 2 et 3 qui sont exprimées de façon constitutive dans tous les types cellulaires, la forme 4 semble être exprimée préférentiellement dans certaines cellules telles que celles des reins et de la rate (22). De plus, la conjugaison de SUMO-4 ne se fait probablement pas sous conditions physiologiques (23).

1.4.2 La conjugaison et la déconjugaison des protéines SUMO

Du point de vue biochimique, le processus de SUMOylation est très semblable à celui de l'ubiquitination et implique une cascade enzymatique se déroulant en quatre étapes (Figure 1). Il y a d'abord maturation de SUMO par clivage de son extrémité C-terminale. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes appelées SENPs (SUMO-specific proteases) et expose le motif di-glycine se trouvant chez la plupart des UBLs. Un lien thioester de haute énergie est ensuite créé entre SUMO et une enzyme E1. SUMO est alors transféré sur une enzyme E2 et la conjugaison au substrat peut être catalysée par une enzyme E3 (24). Cette dernière étape n'est cependant pas toujours nécessaire, la conjugaison pouvant se faire

directement via l'enzyme E2 (25, 26). À ce jour, une E1, une E2 et une dizaine de E3 ont été identifiées chez l'humain pour SUMO (27). La SUMOylation est un processus réversible et hautement dynamique. En effet, les SENPs, qui permettent la maturation de SUMO par exposition du motif di-glycine, catalysent également le clivage de SUMO des substrats (28). La majorité des lysines modifiées par SUMO se trouvent dans un motif consensus Ψ -K-X-E/D, où Ψ représente un acide aminé hydrophobe et X n'importe lequel des acides aminés. Cependant, certaines lysines SUMOylées peuvent être localisées dans un motif non-consensus et les lysines localisées dans un motif consensus ne sont pas toujours SUMOylées. Le motif de SUMOylation phospho-dépendant Ψ -K-X-E/D-X-X-pS-P, où pS représente une sérine phosphorylée, est un autre des motifs possibles (24).

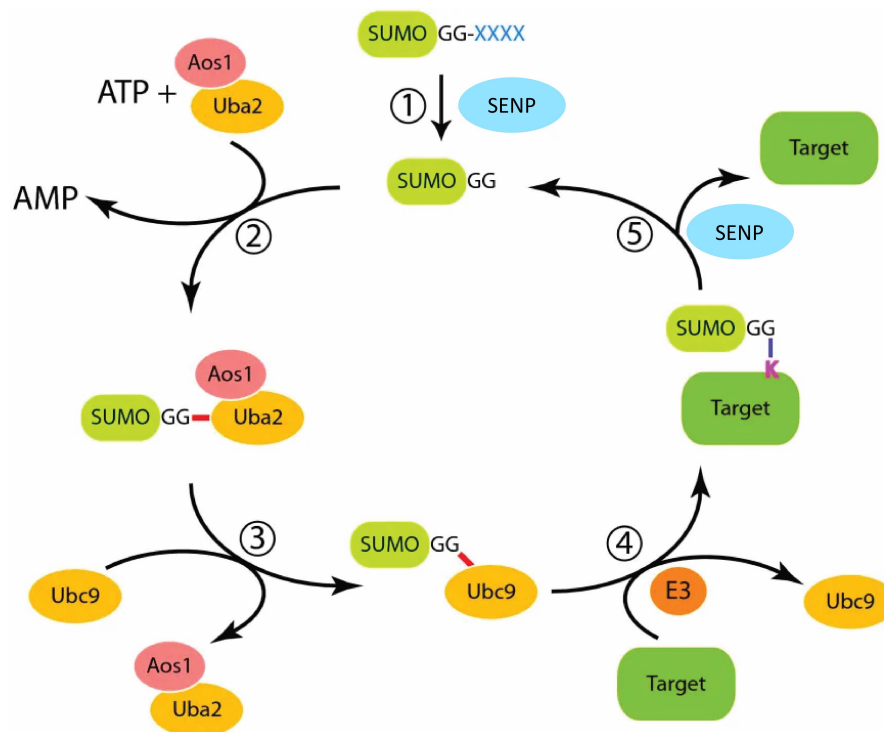


Figure 1. Conjugaison et dé-conjugaison des protéines SUMO. 1 : Maturation de SUMO par clivage protéolytique et exposition du motif di-glycine. 2 : Création du lien thioester entre SUMO et E1 (dimère Aos1 et Uba2). 3 : Transfert de SUMO de E1 à E2 (Ubc9). 4 : Conjugaison de SUMO via E3. 5 : Dé-conjugaison de SUMO. Figure adaptée de Dasso, 2008 (29).

1.4.3 La poly-SUMOylation et le motif d'interaction avec SUMO

Comme la protéine SUMO elle-même est sujette à la SUMOylation, certaines lysines de protéines cibles peuvent être modifiées par une forme polymérique de SUMO, phénomène connu sous le nom de poly-SUMOylation. Les fonctions associées aux chaînes poly-SUMO semblent généralement différentes de celles associées à la mono-SUMOylation. De plus, des chaînes poly-SUMO composées de différents paralogues de SUMO ont déjà été observées (30). Un motif d'interaction avec SUMO, nommé SIM (SUMO interaction motif), permet également à des protéines d'interagir de façon non covalente avec l'UBL. L'interaction dépend du cœur hydrophobe du motif constitué des résidus V/I-X-V/I-V/I (31).

1.4.4 Les fonctions la SUMOylation

La plupart des protéines modifiées par SUMOylation sont nucléaires, bien qu'elles puissent être localisées dans l'ensemble des compartiments cellulaires. La première protéine à avoir été identifiée comme étant SUMOylée est RanGAP1 et sa SUMOylation est liée à sa localisation cellulaire (32). Aujourd'hui, plusieurs rôles sont associés à la SUMOylation, dont le trafic intracellulaire, mais également la réponse aux dommages à l'ADN, la régulation de la transcription, le remodelage de la chromatine et la biogenèse des ribosomes (24). Les protéines SUMOylées sont peu abondantes lorsque comparées, par exemple, aux protéines phosphorylées ou ubiquitylées. Cependant, la balance entre les niveaux de SUMOylation et de dé-SUMOylation demeure importante dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, la dérégulation de la modification semble être impliquée dans plusieurs pathologies telles que les maladies cardiaques, les maladies neurodégénératives et le cancer (33).

1.5 Relations entre les modifications post-traductionnelles

L'existence d'une interrelation entre les différentes modifications post-traductionnelles est maintenant évidente et contribue à divers processus biologiques (34). Le motif de SUMOylation phospho-dépendant en témoigne (35). La SUMOylation peut également servir de signal pour l'ubiquitination de protéines spécifiques par des STUbLs (SUMO-targeted ubiquitin ligases) (36-38). Ainsi, certaines protéines sont adressées au protéasome pour leur

dégradation suite à leur poly-SUMOylation puis à leur poly-ubiquitination. Dans ce cas, la poly-ubiquitination résulte de la reconnaissance des chaînes poly-SUMO par des E3 ubiquitine ligases. De plus, des études montrent que les relations unissant la SUMOylation et d'autres modifications post-traductionnelles pourraient être impliquées dans l'apoptose, et la dérégulation de ce mécanisme de protection est fréquemment en cause dans le développement tumoral (39-41). Pour cette raison, il est intéressant d'étudier la phosphorylation et l'ubiquitination lors de l'étude de la SUMOylation.

1.6 La leucémie

La leucémie est caractérisée par un défaut dans l'hématopoïèse, soit le processus de production des cellules sanguines (Figure 2). Ainsi, la leucémie affecte les cellules souches du sang, ces cellules qui sont, normalement, capables de générer l'ensemble des types cellulaires retrouvés dans le sang. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent se différencier en cellules souches lymphoïdes ou en cellules souches myéloïdes. Les cellules souches lymphoïdes se différencient d'abord en cellules blastiques, puis en lymphocytes, un type de globules blancs. Les cellules souches myéloïdes, quant à elles, se différencient en cellules blastiques avant de devenir des érythrocytes, les globules rouges, des plaquettes, des granulocytes ou des monocytes (42), les deux derniers types cellulaires appartenant eux aussi à la famille des globules blancs. Ainsi, la leucémie se décrit par la prolifération incontrôlée de cellules blastiques qui ont un développement anormal et qui ne deviendront jamais des cellules sanguines matures (43).

1.7 La leucémie aiguë promyélocytaire

1.7.1 Manifestations cliniques et statistiques

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP), le sous-type M3 de la leucémie aiguë myéloblastique (LAM), est un cancer des globules blancs qui prend naissance dans les cellules souches myéloïdes. Décrit comme une entité distincte pour la première fois en 1957 (44), la

maladie se caractérise par l'accumulation dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique de granulocytes immatures, appelés promyélocytes, qui en prenant leur place, empêchent les cellules sanguines saines d'accomplir leurs fonctions physiologiques (Figure 2). Des saignements anormaux, de la fatigue, de la fièvre, une perte de poids, une guérison lente des blessures et la susceptibilité aux infections font partie des premiers symptômes cliniques (45). La LAP représente moins de 10 % de tous les cas de LAM et atteint majoritairement les adultes. Les personnes de moins de 20 ans ne sont effectivement que rarement touchées et l'âge médian se situe à 47 ans (46).

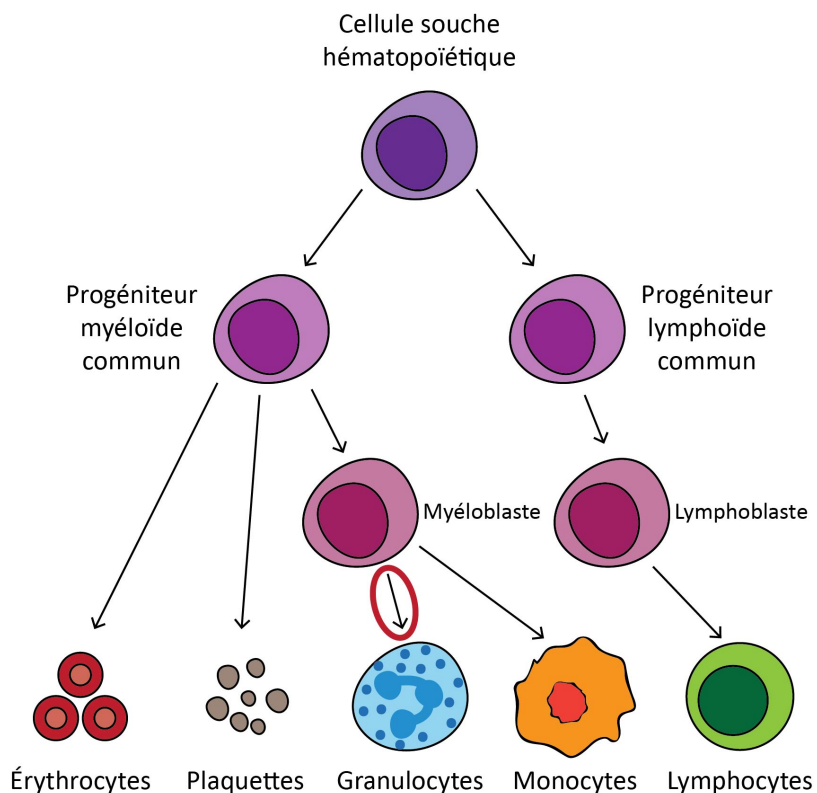


Figure 2. Représentation de l'hématopoïèse. Les cellules souches hématopoïétiques peuvent produire l'ensemble des cellules sanguines matures, soit les globules rouges, les globules blancs, qui comprennent les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes, et les mégacaryocytes, qui permettent la production des plaquettes. La LAP est décrite par une différenciation incomplète des myéloblastes. Figure adaptée de Cedar et Bergman, 2011 (47).

1.7.2 Évolution des traitements

Bien qu'à l'époque de sa première caractérisation comme entité distincte, la LAP ait presque toujours été létale, elle présente aujourd'hui des taux de rémission complète impressionnants s'approchant de 100 % et un taux de survie sans récurrence à 5 ans pouvant dépasser 90 % (48). Contrairement aux autres sous-types de LAM, les traitements utilisés pour éradiquer la LAP ont considérablement évolué au cours des 60 dernières années. Il s'agit également du premier cancer à avoir été traité par thérapie ciblée. La chimiothérapie conventionnelle seule était d'abord utilisée, jusqu'à ce qu'il y ait introduction de l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) en 1985, puis celle du trioxyde d'arsenic (ATO) dans les années 1990 (49). L'ATRA seul permet rarement l'éradication complète de la maladie, alors que l'ATO guérit la plupart des patients. De nos jours, la majorité des cas de LAP nouvellement diagnostiqués sont traités avec une approche sans chimiothérapie combinant l'ATRA et l'ATO, ce traitement étant plus efficace que la combinaison d'abord privilégiée d'ATRA et de chimiothérapie (50-53). Cette combinaison conduit également à moins de rechutes que l'ATO seul (54).

1.7.3 Bases moléculaires de la maladie

La LAP est causée par la translocation du gène $RAR\alpha$ (retinoic acid receptor alpha) se trouvant sur le chromosome 17. Dans la majorité des cas, le gène est impliqué dans une translocation réciproque avec le gène PML (promyelocytic leukemia protein) qui se trouve sur le chromosome 15 (55). La translocation est identifiée $t(15;17)(q21;q22)$. La fusion de ces deux gènes mène à l'expression d'une protéine hybride aux fonctions altérées nommées PML/ $RAR\alpha$ (Figure 3) (49). L'expression de PML/ $RAR\alpha$ compromet à la fois les fonctions normalement assurées par $RAR\alpha$ et par PML et pourrait suffire au développement de la maladie, bien que d'autres altérations puissent en augmenter la gravité (56-59). Ainsi, il y a répression de la transcription des gènes cibles de $RAR\alpha$ et perturbation de la formation de corps nucléaires PML (55, 60). Ces deux événements entraînent la non-différenciation des promyélocytes et la promotion de leur survie par inhibition de l'apoptose (56). D'autres translocations rares sont également possibles dont celle entre les gènes $RAR\alpha$ et PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger protein) (61).

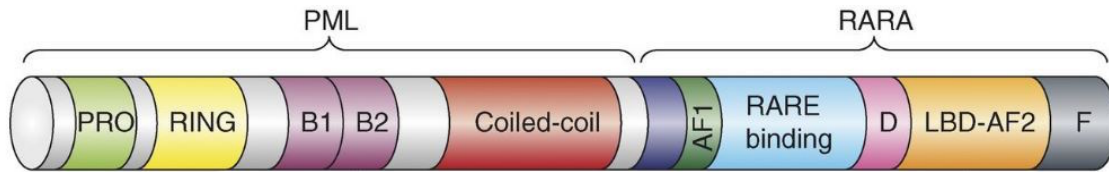


Figure 3. Structure de PML/RAR α . La translocation t(15;17)(q21;q22) est la plus commune chez les patients atteints de la LAP et mène à l'expression de la protéine de fusion PML/RAR α . Figure adaptée de Dos Santos *et al*, 2013, (59).

1.8 PML

1.8.1 Structure de la protéine

PML est un suppresseur de tumeurs identifié à l'origine pour son implication dans la LAP. L'épissage alternatif du gène PML permet la synthèse de sept isoformes de la protéine. La région N-terminale contenant le domaine appelé RBCC/TRIM est conservée chez les sept isoformes, mais celles-ci ne partagent pas la même région C-terminale. Le motif RBCC/TRIM est lui-même composé de quatre domaines, un domaine RING, deux domaines B-Box et une superhélice. L'extrémité N-terminale de six des sept isoformes contient également un signal de localisation nucléaire (NLS) (62). Les différentes isoformes varient en longueur, allant de 435 acides aminés pour PMLVII à 882 pour PMLI (Figure 4). Des fonctions cellulaires spécifiques semblent être associées à chacune des isoformes (63).

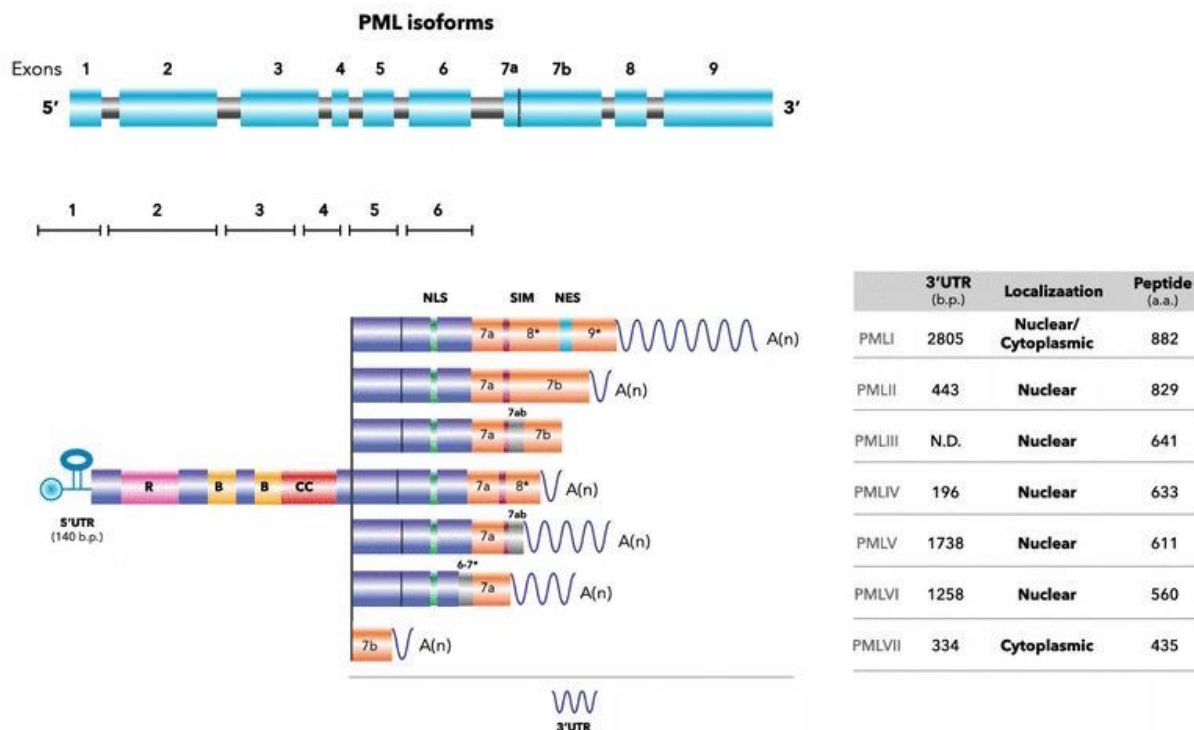


Figure 4. Structure des isoformes de PML. L'épissage alternatif du gène PML permet la synthèse de sept isoformes contenant toutes le domaine RBCC/TRIM. Certaines isoformes contiennent également un SIM. NES : Signal d'exportation nucléaire (nuclear export signal). UTR : Région non traduite (untranslated region). Figure adaptée de Hsu et Kao, 2018 (64).

1.8.2 Corps nucléaires PML

PML est le composant principal de structures circulaires entourant la chromatine, découvertes originellement par microscopie électronique, nommées corps nucléaires PML (PML NBs) (65). Sous conditions normales, ces agrégats protéiques sont présents dans la majorité des cellules humaines, avec des abondances différentes, les niveaux d'expression de PML dépendant, entre autres, du type et du cycle cellulaires. L'expression de PML est également sujette à la régulation en réponse à certains stimuli. Il y a, par exemple, augmentation de la transcription du gène en réponse aux interférons (66). Les noyaux cellulaires contiennent typiquement de 10 à 30 corps nucléaires PML. La partie extérieure de la structure est composée par PML et plusieurs partenaires protéiques sont recrutés par celle-ci

et localisés à l'intérieur. Certaines protéines telles que SP100 et DAXX sont toujours résidentes des corps nucléaires, alors que d'autres, par exemple, p53, s'y trouve uniquement de façon transitoire (67). Généralement, sous conditions de stress, les corps nucléaires PML augmentent en nombre et en taille. Plusieurs fonctions sont attribuées à ces structures dynamiques comme la réponse au stress, la réparation de l'ADN, le renouvellement des cellules souches, la réponse virale, la sénescence et l'apoptose (68, 69). Les animaux PML^{-/-} présentent d'ailleurs une réponse altérée au stress (70).

1.8.3 Formation des corps nucléaires PML

Les corps nucléaires PML sont hautement sujets à être modifiés, entre autres, par SUMOylation, phosphorylation et ubiquitination. Les partenaires protéiques qui y sont recrutés sont eux aussi sujets à de nombreuses modifications post-traductionnelles et peuvent également y être dégradés. Ainsi, la SUMOylation des corps nucléaires PML permet le recrutement de partenaires protéiques et augmente la SUMOylation de ces protéines afin d'en réguler directement les fonctions ou d'en faciliter la régulation par d'autres modifications post-traductionnelles. Les partenaires protéiques peuvent donc être activés, inactivés ou dégradés suite à leur recrutement (71). Une autre caractéristique importante de PML réside dans le fait que la protéine contient à la fois des sites de SUMOylation et un SIM (68, 69). Le premier modèle proposé pour expliquer la cinétique de formation des corps nucléaires PML plaçait la SUMOylation au cœur du processus. Dans ce modèle, SUMO est responsable de construire la structure circulaire extérieure des corps nucléaires. Les unités de construction, soit les protéines PML individuelles, s'associent et restent collées les unes aux autres via les interactions SUMO-SIM (72). Ce modèle a toutefois été revu, alors que des études ont montré qu'un mutant dépourvu à la fois de trois sites de SUMOylation et du SIM de PML était capable de former des corps nucléaires morphologiquement similaires aux corps nucléaires sauvages (68, 69). Le modèle alternatif suggère que les corps nucléaires sont formés par des ponts disulfures liant les cystéines des unités de PML (Figure 5). Ainsi, l'oxydation de PML permet la formation des liens disulfures, ce qui induit la dimérisation puis la multimérisation des unités de PML et la création de la couche externe des corps nucléaires (68, 69). Une étude récente montre que la formation des corps nucléaires PML est, en fait, dépendante de la tétramérisation de PML par le biais de son domaine RING (73). La SUMOylation occupe

également un rôle essentiel dans ce modèle. Effectivement, une fois formés, les corps nucléaires sont massivement SUMOylés en réponse au recrutement de l'enzyme E2 de conjugaison de SUMO, Ubc9. La modification post-traductionnelle permet alors le recrutement des protéines résidentes par les interactions SUMO-SIM. La SUMOylation des corps nucléaires PML serait ainsi facultative à leur formation, mais essentielle au recrutement des partenaires protéiques et donc à la réalisation des fonctions cellulaires qui sont associées à ces structures (68, 69).

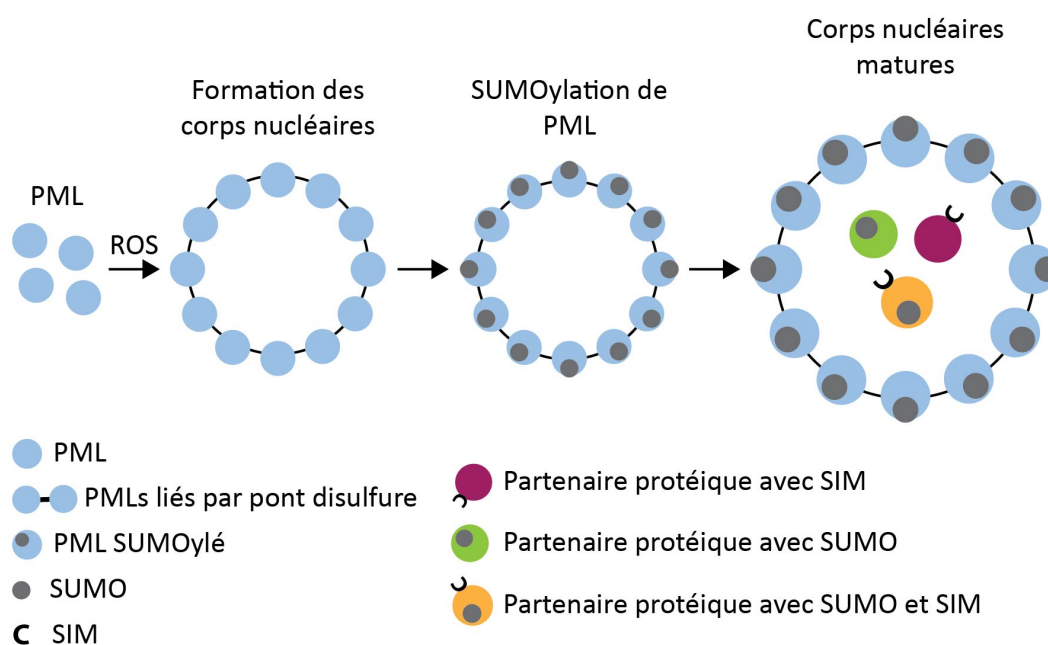


Figure 5. Modèle de formation des corps nucléaires PML. Le stress oxydatif induit la multimérisation de PML, formant les corps nucléaires. La SUMOylation de PML est ensuite nécessaire à l'obtention des corps nucléaires matures capables de recruter des partenaires protéiques. ROS : Dérivé réactif de l'oxygène (reactive oxygen specie). Figure adaptée de Sahin *et al*, 2014, (69).

1.9 RAR α

RAR α est le premier membre de la famille des récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs) à avoir été identifié. La famille comprend également RAR β (retinoic acid receptor beta) et

RAR γ (retinoic acid receptor gamma). Contrairement à RAR α qui est exprimé de façon constitutive, ces deux derniers récepteurs présentent un patron d'expression plus complexe, dicté, entre autres, par le type cellulaire (74). RAR α exerce ses fonctions sous forme d'un hétérodimère avec RXR α (retinoid X receptor alpha). La liaison de l'acide rétinoïque à RAR α /RXR α permet l'activation de l'hétérodimère et la régulation de ses gènes cibles par recrutement de coactivateurs. Ainsi, le récepteur nucléaire va reconnaître une séquence d'ADN appelée RARE (retinoic acid response element) se trouvant dans la majorité des promoteurs des gènes régulés par l'acide rétinoïque et activer la transcription de ces gènes. En absence de ligand, l'hétérodimère va plutôt recruter des corépresseurs afin de garder la chromatine dans un état inactif (75). L'acide rétinoïque dans la cellule provient directement du milieu extracellulaire ou encore de l'oxydation de la vitamine A (76). Certains gènes régulés par RAR α /RXR α sont responsables du catabolisme de RAR α , alors qu'un élément RARE se trouve dans le promoteur du gène RAR α . Ces deux mécanismes permettent une régulation fine de la quantité de RAR α présente dans la cellule (75). Parmi les autres gènes sous contrôle du récepteur nucléaire, certains sont impliqués dans des fonctions telles que la survie, la croissance et la différenciation cellulaires (77). Ainsi, RAR α , en présence de son ligand, semble favoriser la différenciation des cellules de la lignée myéloïde, mais aurait un effet contraire en absence d'acide rétinoïque. Il peut même y avoir accumulation de granulocytes immatures chez les souris présentant un manque en acide rétinoïque (78). De plus, la signalisation induite par l'acide rétinoïque semble être altérée dans certains cancers (76).

1.10 La protéine de fusion PML/RAR α

Comme mentionné précédemment, l'expression de PML/RAR α semble permettre, à elle seule, le développement de la LAP chez la souris, indiquant que la protéine de fusion est une des principales causes moléculaires, voire la seule, de la maladie (57). La protéine chimérique compromet à la fois les fonctions assurées normalement par PML et par RAR α (Figure 6). Ainsi, la formation des corps nucléaires PML et la signalisation de RAR α sont réprimées chez les promyélocytes. Les corps nucléaires formés par PML/RAR α sont moins abondants dans les cellules promyélocytaires que les corps nucléaires PML dans les cellules

non leucémiques. Ils ont, en plus, une morphologie et une localisation différentes ainsi que des fonctions altérées (79). La perturbation des corps nucléaires semble occuper deux rôles distincts dans le développement de la leucémie aiguë promyélocytaire. Elle pourrait d'abord nuire à la différenciation des granulocytes en cellules sanguines matures. Ainsi, des études montrent que les corps nucléaires sont impliqués dans l'autorenouvellement, aussi bien des cellules saines que des cellules souches cancéreuses (79). De plus, la dégradation de la protéine de fusion favorise la différenciation des cellules leucémiques. L'autre rôle de la perturbation concerne l'apoptose. En effet, la signalisation des corps nucléaires semble initier ce mécanisme de suppression tumorale, sous certaines conditions, entre autres, en activant p53 (67). PML/RAR α semble donc permettre l'inhibition de l'apoptose, ce qui augmente le potentiel d'autorenouvellement des progéniteurs myéloïdes. De plus, la protéine de fusion PML/RAR α réprime la signalisation normalement induite par RAR α . Ainsi, PML/RAR α lie plus fortement l'ADN, et peut le faire sous forme de monomère. Il y a donc répression des gènes sous régulation de l'acide rétinoïque, ce qui pourrait expliquer, en partie, le fait que les granulocytes ne se différencient pas (55).

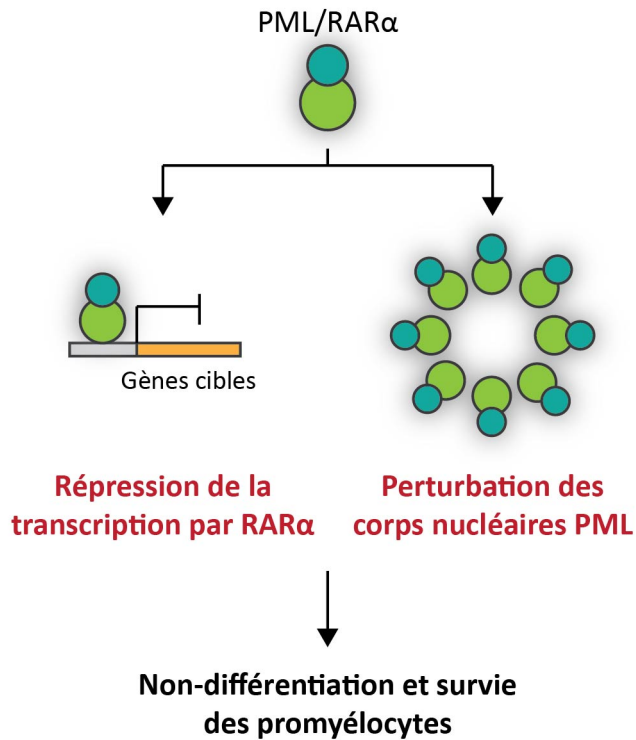


Figure 6. Signalisation de PML/RAR α . La protéine de fusion inhibe la transcription normalement assurée par RAR α et inhibe la formation des corps nucléaires PML ce qui mène à la différenciation incomplète et à la survie des cellules leucémiques. Figure adaptée de Lallemand-Breitenbach *et al*, 2012 (80).

1.11 Le trioxyde d'arsenic

1.11.1 L'arsenic

L'arsenic, bien connu sous sa forme inorganique pour être un poison puissant et imperceptible, présente, néanmoins, de nombreuses qualités lorsqu'administré en faibles doses. Son utilisation dans la médecine remonte, ainsi, à plus de 2000 ans. Il était autrefois employé en Grèce et en Chine pour traiter de multiples maladies. Dans les années 1900, il a été remplacé par l'arrivée des antibiotiques et des agents chimiothérapeutiques, jusqu'à ce qu'un remède traditionnel chinois contenant de l'arsenic soit reconnu comme étant efficace

pour traiter la LAP. Des études ont alors montré que le composé actif dans cette thérapie était, en fait, l'ATO (81).

1.11.2 Traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire

L'ATO est maintenant reconnu internationalement et utilisé comme agent thérapeutique dans le traitement de la LAP, soit seul, soit en combinaison ou suite à un traitement avec l'ATRA, et ce, depuis plus de 20 ans. L'utilisation de l'ATO seul mène à la différenciation ou à la mort des promyélocytes *in vivo* et, en clinique, à la rémission de 70 % des patients atteints de la LAP (82). Les agents thérapeutiques agissent tous les deux en dégradant PML/RAR α (50, 80). L'ATO dégrade la protéine de fusion via son unité PML en favorisant sa SUMOylation, suivie de son ubiquitination, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome (83). La dégradation de la protéine de fusion permettrait aux protéines PML provenant de l'allèle non réarrangé du gène de reformer des corps nucléaires sauvages, ce qui pourrait induire l'apoptose des cellules leucémiques (70). L'ATO favorise également la formation des corps nucléaires PML chez les cellules non leucémiques. En plus de dégrader PML/RAR α , l'agent thérapeutique semble donc favoriser la formation des corps nucléaires avec les protéines sauvages PML. Ainsi, la dégradation de la protéine chimérique par l'ATO et l'ATRA empêcherait l'inhibition de l'apoptose ou favoriserait la différenciation des cellules promyélocytaires, les faisant perdre leur pouvoir d'autorenouvellement (Figure 7) (84).

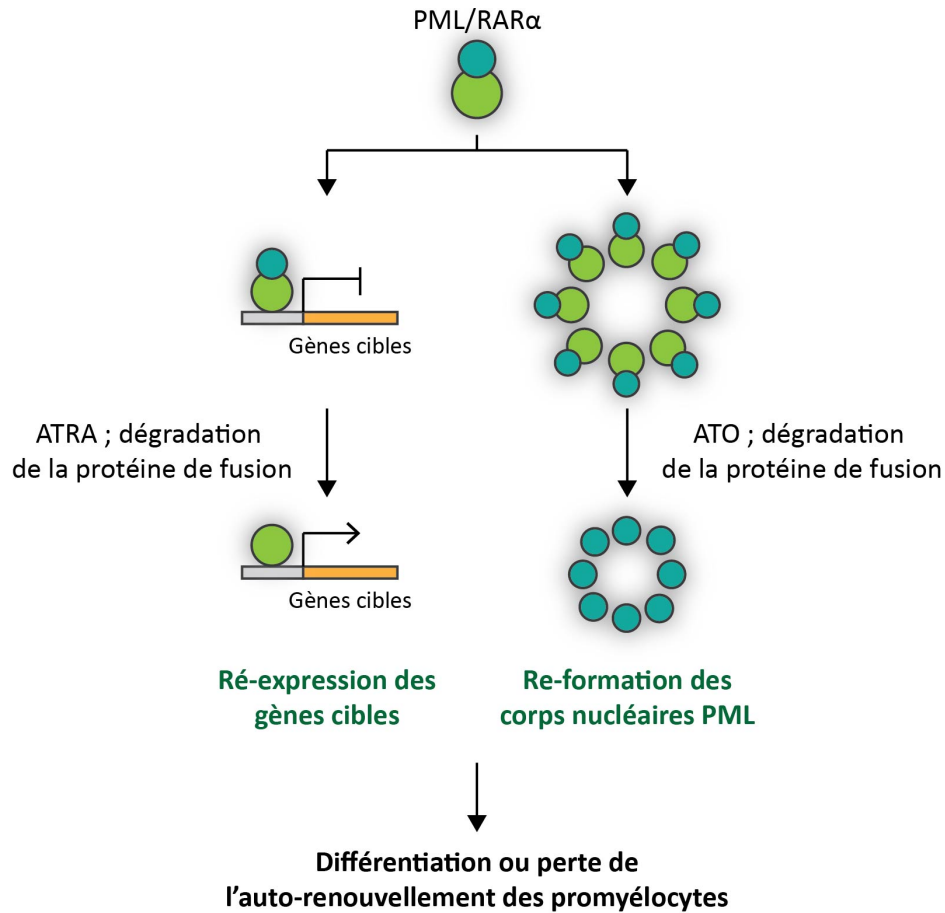


Figure 7. Dégradation de PML/RAR α . L'ATO et l'ATRA dégradent la protéine de fusion PML/RAR α , permettant à PML et à RAR α de retrouver leur rôle physiologique, ce qui mène à la différenciation ou à l'élimination des cellules cancéreuses. Figure adaptée de de Thé *et al*, 2017 (82).

1.11.3 Régulation des enzymes

Certaines enzymes responsables de la modification post-traductionnelle des protéines sont régulées en réponse à l'ATO. Il est possible de penser que des E3 SUMO ligases, des E3 ubiquitine ligases et des kinases puissent être modifiées en réponse à l'ATO influençant ainsi la modification d'autres protéines. Ainsi, l'ATO pourrait interagir avec un nombre limité de protéines, mais engendrer de façon indirecte une régulation importante des modifications post-traductionnelles. La littérature rapporte que l'ATO interagit avec PML, permettant la

formation des corps nucléaires PML qui représentent un foyer où différents événements de modifications post-traductionnelles se produisent, mais des enzymes sont également régulées en réponse à l'ATO (85, 86). Par exemple, la kinase Akt est inactivée par dé-phosphorylation suite à un tel traitement (87). Son inactivation pourrait ainsi mener à la diminution de la phosphorylation de ses substrats.

1.12 L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus d'autodestruction cellulaire finement régulé, essentiel à de multiples fonctions chez les organismes multicellulaires (88). Elle se produit de façon normale dans le développement pour maintenir l'homéostasie des populations de cellules, mais elle peut également occuper un rôle protecteur (89). Par exemple, les cellules dont l'ADN a subi des dommages importants peuvent entrer en apoptose pour protéger l'organisme du développement tumoral. L'apoptose peut se produire en réponse à des signaux provenant de la cellule elle-même ou de l'environnement extérieur via la liaison de ligands spécifiques sur des récepteurs de mort à la surface de la cellule (Figure 8). La mort cellulaire programmée est caractérisée par une série de changements conduisant, en dernier lieu, à la condensation de la chromatine, à la fragmentation de l'ADN, au bourgeonnement de la membrane et enfin à l'élimination des corps apoptotiques par les cellules immunitaires sans endommager les cellules environnantes (90). Une mauvaise régulation de l'apoptose est impliquée dans de nombreuses maladies humaines, y compris le cancer (91, 92).

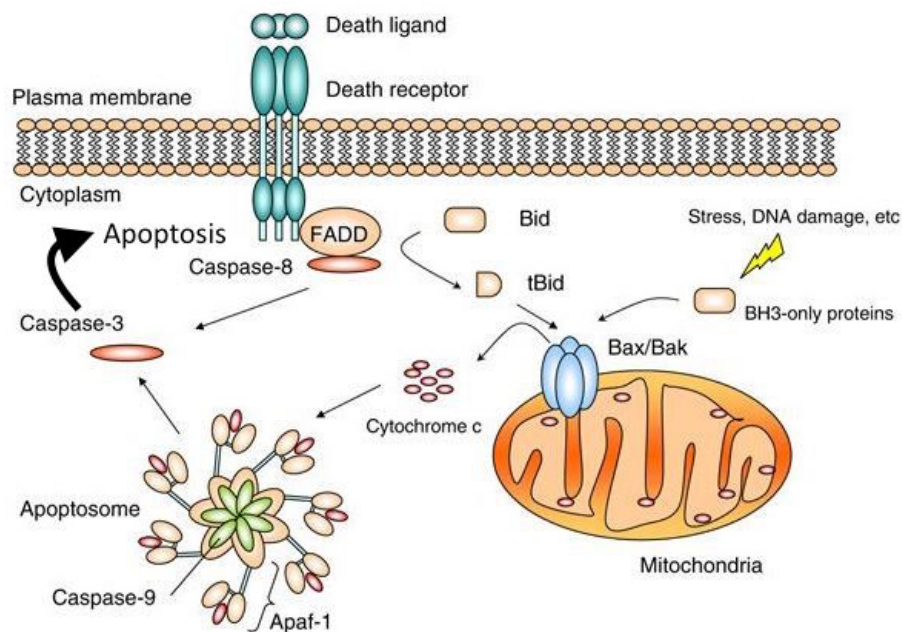


Figure 8. Représentation des mécanismes régulant l'apoptose. La mort cellulaire programmée peut résulter d'un stress intrinsèque ou extrinsèque. L'activation des caspases est la dernière étape des changements qui mènent à l'apoptose. Figure adaptée de Li et Yuan, 2008 (93).

1.13 Les caspases

Les caspases (cysteine-aspartic proteases), une famille de protéases à cystéine hautement conservées d'une espèce à l'autre, sont au cœur de l'apoptose (94-96). Afin d'assurer une régulation précise de l'activité des caspases, celles-ci sont exprimées sous forme de zymogènes et leur activation a lieu lorsqu'elles sont clivées par d'autres caspases, appelées caspases initiatrices (caspase-1, -4, -5), elles-mêmes préalablement activées. Une fois actives, les caspases effectrices (caspase-3, -5, -7) vont cliver des substrats spécifiques. Les sites de clivage reconnus par les différentes caspases sont uniques à chacune d'elles, bien qu'ils contiennent tous un résidu aspartate. Le résultat du clivage protéolytique dépend de chaque substrat. Il peut donc y avoir perte ou gain de fonction pour une protéine clivée par une caspase. La cascade des caspases est à l'origine des changements biochimiques caractéristiques de l'apoptose et la caspase-3 est probablement le membre le plus important des caspases

effectrices (97). L'un de ses substrats les mieux caractérisés est PARP1 (poly [ADP-ribose] polymerase 1) (98).

1.14 PARP1

PARP1, le membre fondateur des protéines de la famille PARP qui contient 17 autres membres, est une enzyme conservée dans l'évolution des eucaryotes (99). PARP1 est d'ailleurs essentielle chez la souris et son dysfonctionnement est létal pour l'embryon (100). PARP1 joue un rôle central dans la réponse aux dommages à l'ADN en catalysant sa propre poly-ADP-ribosylation et celle de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. PARP1 attache, ainsi, des unités d'ADP-ribose aux résidus glutamate, aspartate ou lysine de protéines cibles. L'accumulation de ces unités conduit à la formation de chaîne de poly-ADP-ribose (PAR) (Figure 9) (101). La détection des sites de dommages par PARP1 est un des premiers événements de la réponse aux dommages à l'ADN et la modification des protéines cibles par les chaînes de PAR peut jouer différents rôles, entre autres influencer la localisation cellulaire des protéines, leurs interactions avec d'autres partenaires protéiques, ou leur liaison à l'ADN (102). L'enzyme est activée en réponse à différents types de lésions de l'ADN, que ce soit les cassures simple-brin ou les cassures double-brin. La structure de la protéine nucléaire est bien caractérisée et contient un domaine de liaison à l'ADN, lui-même composé de motifs à doigts de zinc, un domaine BRCT et un domaine catalytique (103, 104). PARP1 soulève un intérêt certain en recherche puisque la protéine est surexprimée dans plusieurs cancers et qu'elle pourrait servir de cible thérapeutique, en raison de son implication dans la réponse aux dommages à l'ADN (105). Différentes études montrent déjà le potentiel d'utilisation des inhibiteurs de PARP1 dans l'élimination des cellules cancéreuses, lorsque combinés à d'autres drogues (106, 107). De plus, PARP1 est clivée par la caspase-3 en réponse à l'ATO et son clivage protéolytique est nécessaire lors de l'induction de l'apoptose (108-110).

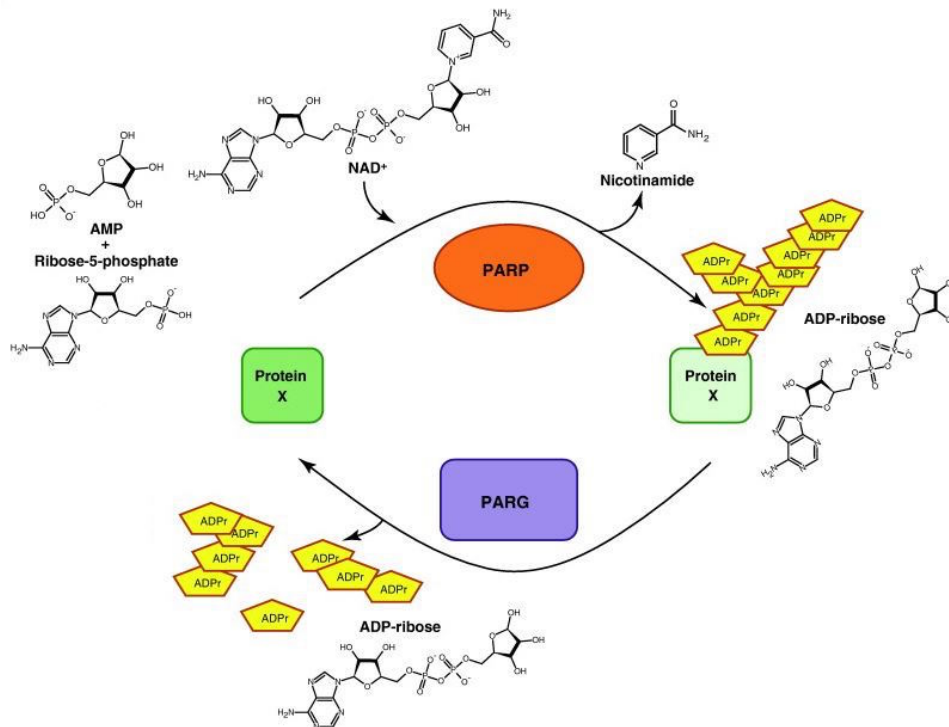


Figure 9. Représentation de l'activité catalytique de PARP. Les protéines de la famille PARP catalysent l'ajout d'ADP-ribose aux protéines cibles (PARylation). La déconjugaison des chaînes de PAR (dePARylation) est catalysée par l'enzyme PARG (poly ADP-ribose glycohydrolase). Figure adaptée de Briggs et Bent, 2011, (101).

1.15 La protéomique basée sur la spectrométrie de masse

1.15.1 Approches en protéomique

La spectrométrie de masse est une technique sensible permettant l'analyse de molécules par mesure de leur rapport masse sur charge (m/z). Elle permet, entre autres, d'identifier et de quantifier un grand nombre de protéines contenues dans un échantillon biologique complexe. Deux principales méthodes en protéomique permettent l'identification des protéines contenues dans un tel échantillon, soit l'approche *top-down* et l'approche *bottom-up*. En protéomique *top-down*, les protéines intactes sont injectées directement dans le spectromètre de masse, alors qu'en protéomique *bottom-up*, les protéines sont d'abord digérées en peptides et ce sont ces derniers qui sont injectés. L'approche *top-down* offre

quelques avantages, par exemple, elle peut permettre la distinction entre les différentes isoformes d'une même protéine (111). Cependant, la méthode requiert des outils bioinformatiques performants afin de faire l'analyse des spectres de masse des fragments de protéines entières qui ont tendance à être complexes (112). Ainsi, l'approche *bottom-up* était longtemps privilégiée et reste aujourd'hui une des approches les plus utilisées. Entre autres, en raison de sa simplicité et de sa fiabilité, mais également parce qu'elle offre de nombreux avantages tels que l'efficacité de séparation et d'identification des peptides à partir de la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (113).

1.15.2 Extraction des protéines

Dans une expérience classique en protéomique *bottom-up*, les protéines sont d'abord extraites d'un échantillon biologique par lyse cellulaire (Figure 10). Les échantillons utilisés peuvent provenir de sources variées, par exemple, de cellules primaires, de cellules secondaires ou de tissus. Différentes techniques permettent de lyser les cellules, comme la lyse osmotique ou la lyse mécanique. Il est également possible de séparer les différents compartiments cellulaires et d'en extraire les protéines de façon spécifique.

1.15.3 Séparation et purification des protéines

Une fois les protéines extraites, il est possible de les séparer. Une méthode souvent utilisée est le SDS-PAGE, dans laquelle les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire (114). De plus, il est possible de purifier un certain type de protéines, par exemple, si des étiquettes y sont ajoutées.

1.15.4 Digestion des protéines

Il est ensuite nécessaire de digérer les protéines en peptides à l'aide d'enzymes. La trypsine est l'endoprotéase la plus utilisée à cette fin. La trypsine provient du suc pancréatique des animaux et est impliquée dans la digestion des aliments. Elle hydrolyse les liens peptidiques du côté C-terminal après les résidus lysine et arginine. Elle est fort utile en protéomique basée sur la spectrométrie de masse puisqu'elle génère des peptides d'une taille optimale pour leur identification. En effet, en raison de la répartition des lysines et des

arginines dans le protéome de plusieurs espèces, la trypsine génère des peptides d'une quinzaine d'acides aminés en moyenne. Les peptides d'une telle longueur sont généralement uniques à une seule protéine sans pour autant générer des spectres trop complexes (115). De plus, puisqu'elle clive après les résidus lysine et les arginine, tous les peptides issus de la digestion tryptique contiennent au minimum un acide aminé chargé, ce qui facilite leur ionisation et leur fragmentation.

1.15.5 Séparation et purification des peptides

Suite à l'obtention des peptides par digestion des protéines, plusieurs étapes de purification ou de séparation peuvent être réalisées. Ainsi, les purifications peuvent permettre l'analyse d'un type de protéines d'intérêt. Les immunopurifications s'avèrent ici très utiles. Les séparations, souvent désignées par le terme fractionnement, permettent, quant à elles, d'augmenter la couverture de séquence des protéines à analyser. En effet, moins il y a de peptides qui entrent dans le spectromètre de masse au même moment, plus les chances augmentent d'identifier les peptides se trouvant dans l'échantillon, même ceux retrouvés en faible abondance. Fractionner les échantillons peut, ainsi, s'avérer utile avant l'injection des peptides dans l'appareil. Différents types de chromatographie peuvent servir de fractionnement telle la chromatographie échangeuse d'ions qui est fréquemment utilisée (116). Les étapes de purification et de séparation sont toutefois théoriquement facultatives et il est possible d'analyser directement les peptides extraits de l'échantillon biologique par spectrométrie de masse.

1.15.6 Injection des peptides en spectrométrie de masse

1.15.6.1 La chromatographie liquide

La dernière étape d'une expérience classique en protéomique *bottom-up* est l'injection des peptides dans le spectromètre de masse. Un système de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem est généralement utilisé (LC-MS/MS) (117). Cette approche, qui utilise la chromatographie liquide pour analyser un mélange de protéines, est connue sous le nom de protéomique *shotgun* (113). Les peptides sont ainsi séparés avant leur entrée dans le système MS/MS, ce qui augmente, une fois de plus, la couverture de séquence

protéique. La plupart du temps, une chromatographie en phase inverse est privilégiée et les peptides sont donc séparés en fonction de leur hydrophobicité. Les peptides sont ensuite injectés dans le spectromètre de masse. L'appareil est constitué de trois composantes distinctes, soit la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

1.15.6.2 La source d'ionisation

Les molécules analysées en spectrométrie de masse doivent respecter deux conditions. Elles doivent être chargées, donc sous forme d'ions, et doivent être à l'état gazeux. Différentes techniques permettent l'ionisation des molécules et leur passage à la phase gazeuse, par exemple, la nébulisation électrostatique (ESI) et la désorption/ionisation au laser assistée par matrice (MALDI) (118). La nébulisation électrostatique est généralement utilisée en protéomique *shotgun* en raison de sa compatibilité avec la chromatographie liquide et se décrit par l'application d'un voltage de haute intensité entre l'émetteur qui suit la colonne chromatographique et l'entrée du spectromètre de masse. La solution traversant ce champ électrostatique et qui contient les peptides va d'abord former des gouttelettes pour ensuite diminuer de volume avec le temps en raison de l'évaporation du solvant. Les peptides, sous forme d'ions, sont expulsés hors des gouttelettes lorsque celles-ci atteignent la limite de Rayleigh (119).

1.15.6.3 L'analyseur de masse et le détecteur

Une fois dans le spectromètre de masse, le ratio m/z des ions est mesuré par l'analyseur, le constituant principal du spectromètre de masse. Différents analyseurs de masse permettent de mesurer ce ratio tels que le temps de vol, les quadripôles et l'orbitrap. L'orbitrap, généralement utilisé en protéomique, agit à la fois comme analyseur de masse et comme détecteur. Il est constitué d'une électrode externe cylindrique dans laquelle se trouve une électrode en forme de fuseau. Les ions adoptent un mouvement de rotation autour de l'électrode interne en plus d'un mouvement axial le long de cette même électrode. Le mouvement axial dépend du rapport m/z et induit un courant électrique qui est enregistré et converti en un signal par un calcul de transformée de Fourier (118, 120). La quantification des protéines se fait au niveau MS en fonction de l'intensité des ions. Ensuite, les peptides sont sélectionnés, puis fragmentés et l'identification des protéines se fait au niveau MS/MS.

Différentes méthodes peuvent servir à fragmenter les peptides, par exemple, la dissociation par transfert d'électrons (ETD), la dissociation induite par collision (CID) et la dissociation par collision à haute énergie (HCD) (121).

1.15.6.4 L'analyse des données

Les spectres de masse des fragments de peptides obtenus expérimentalement sont comparés aux spectres de masse théoriques issus d'une banque de données. Ainsi, un logiciel de recherche effectue la digestion *in silico* des protéines de la base de données choisie, par exemple, le protéome humain, et génère les spectres correspondants avant de les comparer aux spectres expérimentaux (122). Le logiciel attribue également un score à chacun des spectres obtenus expérimentalement en fonction de leur similarité avec les spectres obtenus *in silico*. Afin de réduire le nombre d'identifications incorrectes, il est possible de faire appel à une base de données, appelée *target-decoy*, qui contient la liste de toutes les protéines du protéome à laquelle sont ajoutées les séquences inverses de celles-ci (123). Si des séquences correspondent aux séquences inverses ajoutées ainsi à l'espace de recherche, elles seront désignées comme incorrectes. Cette stratégie permet de définir la proportion de faux positifs en déterminant le nombre de résultats incorrects dans un jeu de données final.

1.15.6.5 Méthodes de marquage pour la quantification

La quantification des protéines peut se faire de diverses façons telles que sans marquage, par marquage chimique ou par marquage métabolique. Dans une méthode sans marquage, la quantification s'appuie sur la mesure de l'intensité des pics chromatographiques des différents ions et en marquage chimique, les protéines sont marquées, après leur extraction, par l'ajout d'étiquettes chimiques (124). Dans la méthode de marquage métabolique la plus commune, appelée SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture), les protéines sont marquées par incorporation métabolique en culture cellulaire d'acides aminés, généralement les résidus lysine et arginine, contenant des isotopes stables (125). Ces deux dernières méthodes sont plus précises et permettent la quantification relative des peptides issus de différentes conditions par rapport à un contrôle.

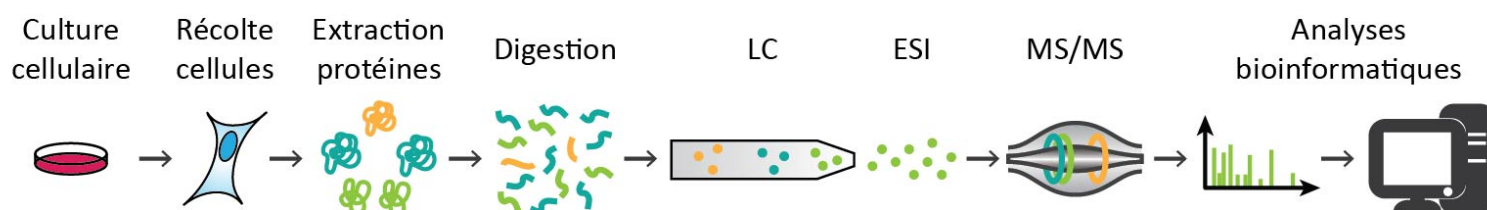


Figure 10. Représentation d'une expérience classique en protéomique. Les protéines sont extraites de l'échantillon biologique, par exemple, de cellules en culture. Les protéines sont digérées en peptides, puis ceux-ci sont injectés dans le système de LC-MS/MS avant l'analyse bioinformatique des données. Des étapes de purification et de séparation peuvent s'ajouter à ces étapes génériques. Figure adaptée de Meissner et Mann, 2014 (126).

2. Élaboration du projet de recherche

2.1 Problématique

Ce projet de recherche s'articule autour de la façon dont les protéines sont régulées en SUMOylation, en phosphorylation et en ubiquitination en réponse à l'ATO et aux rôles associés à ces modifications post-traductionnelles dans le cadre du traitement de la LAP. Malgré le fait que l'ATO soit reconnu comme étant efficace dans le traitement de la maladie, le mécanisme d'action de l'agent thérapeutique n'est pas complètement élucidé. Il est connu que le mécanisme implique la SUMOylation, mais, à l'exception de la protéine PML identifiée comme étant SUMOylée, peu de choses sont actuellement connues sur les protéines modifiées par SUMO et les rôles associés à cette modification, dans le contexte du traitement. Le projet s'intéresse également aux relations qui unissent différentes modifications post-traductionnelles. Qu'y a-t-il au-delà de PML? Y a-t-il d'autres protéines qui sont régulées dans leurs modifications post-traductionnelles et qui occupent un rôle dans la guérison? Le projet pourrait permettre de mieux comprendre comment la guérison de la LAP peut être induite par SUMOylation. Une meilleure compréhension de ce mécanisme pourrait permettre l'amélioration du traitement et son application pour traiter d'autres cancers.

2.2 Hypothèse de travail

La plupart des protéines ne devraient pas montrer de changements dans leurs modifications post-traductionnelles suite à un traitement à l'ATO. Cependant, certaines protéines pourraient être régulées par SUMOylation, phosphorylation ou ubiquitination. La SUMOylation de PML sur trois de ses lysines, telle que documentée dans la littérature, devrait, entre autres, augmenter en réponse à l'ATO. Quelques autres protéines pourraient montrer une régulation importante dans leur modification, et des rôles biologiques pourraient être associés à cette régulation. Ainsi, les protéines présentant des changements dans leurs modifications post-traductionnelles pourraient être impliquées dans l'apoptose des cellules

leucémiques ou encore dans la dégradation de PML/RAR α conduisant à la différenciation de ces cellules en cellules sanguines matures.

2.3 Objectifs

2.3.1 Objectif général

- Étudier la régulation de la SUMOylation et d'autres modifications post-traductionnelles en réponse à l'ATO afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire par lequel cet agent thérapeutique exerce son action dans le cadre du traitement de la LAP et souligner l'importance de la SUMOylation dans ce mécanisme

2.3.2 Objectifs spécifiques

- Quantifier les changements en SUMOylation, en phosphorylation et en ubiquitination en réponse à deux concentrations différentes d'ATO
- Investiguer le rôle potentiel associé à la modification d'une protéine d'intérêt
- Étudier afin de mieux comprendre les fonctions de la SUMOylation de façon générale

3. Matériel et méthodes

3.1 Culture cellulaire

Des cellules exprimant de manière stable un mutant de SUMO3 ont été obtenues en transfectant des cellules HEK293 avec le gène 6xHis-SUMO-3-Q87R-Q88N contenu dans un vecteur d'expression (pcDNA3) et en faisant la sélection à la néomycine (0,5 mg/mL) (30, 127). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de FBS, 1% de L-Glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine et 750 µg/mL de généticine à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Pour les immunobuvardages, les cellules étaient soit non traitées, soit traitées à l'ATO aux concentrations et pour les temps indiqués. Les cellules ont été lysées dans un tampon composé d'urée 8 M et de Tris-HCl 20 mM à pH 8,0 et 20 µg de chaque échantillon ont été déposés sur un gel SDS-PAGE avec gradient de 4 à 12%. Pour l'expérience de spectrométrie de masse à grande échelle, les cellules ont été cultivées dans du DMEM contenant des formes isotopiques légères (0Lys, 0Arg), moyennes (4Lys, 6Arg) ou lourdes (8Lys, 10Arg) de résidus lysine et arginine pendant au moins 6 passages pour assurer un marquage des protéines complet. Pour chaque condition, 2 flasques à 3 étages ont été cultivées. Les cellules étaient soit non traitées, soit traitées avec 1 µM d'ATO ou 10 µM d'ATO pendant 4h. Pour la purification d'affinité au NiNTA réalisée sur les cellules traitées à l'ATO, les cellules ont été traitées avec 10 µM d'ATO pour les temps indiqués. Pour l'essai caspase, les cellules ont été traitées avec 10 µM de MG132 (inhibiteur du protéasome) pendant 18h.

3.2 Expérience de spectrométrie de masse à grande échelle

3.2.1 Récolte et lyse des cellules

Les cellules ont été retirées des récipients de culture par pipetage. Les cellules ont été centrifugées à 215 g pendant 3 minutes, suivies de 2 lavages du culot avec du PBS. Les cellules ont été lysées dans un tampon d'incubation dénaturant (guanidinium 6 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris-HCl 10 mM, 2-chloroacétamide 20 mM, 2-mercaptoéthanol 5 mM, pH 8,0),

puis soniquées. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. Pour chacun des réplicats, 10 mg de protéines de chaque condition ont été combinés.

3.2.2 Purification d'affinité au NiNTA

Les purifications d'affinité au NiNTA sont effectuées selon une méthode développée dans notre laboratoire (127). Pour chacun des réplicats, un total de 30 mg de protéines a été incubé avec 600 μ L de billes d'agarose NiNTA pendant 16h à 4°C sous rotation. Le surnageant a été conservé pour la purification des peptides phosphorylés. Les billes ont été lavées 1 fois avec 10 mL de tampon d'incubation dénaturant, 4 fois avec 10 mL de tampon de lavage dénaturant (urée 8M, NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, 2-chloroacétamide 20 mM, 2-mercaptoéthanol 5 mM, 20 mM imidazole, pH 6,3), puis 1 fois avec 5 mL d'eau froide. Les billes ont été remises en suspension dans 3 mL de bicarbonate d'ammonium 100 mM. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. La digestion des protéines sur les billes a été réalisée en ajoutant de la trypsine à un ratio de 1:20 (poids/poids) (trypsine:protéines) et en incubant les billes et la trypsine pendant 16h à 37°C sous rotation. Les peptides résultants ont été acidifiés par addition d'acide trifluoroacétique (TFA) à une concentration finale de 1%. Les peptides ont été dessalés sur des cartouches à phase inverse selon les instructions du fabricant avant d'être séchés dans un SpeedVac.

3.2.3 Préparation de billes couplées à l'anticorps anti-K(GG)

Le contenu d'un flacon commercial de billes d'agarose sur lesquelles l'anticorps anti-K(GG) se trouve a été lavé 3 fois avec 1 mL de triéthanolamine 200 mM à pH 8,3. Pour le couplage, 1 mL de DMP 20 mM dans du triéthanolamine 200 mM à pH 8,3 a été ajouté et l'échantillon a été incubé pendant 1h à température ambiante sous rotation. La réaction a été arrêtée en ajoutant 50 μ L de Tris-HCl 1 M à pH 7,5 et en incubant l'échantillon pendant 30 minutes sous rotation. Les billes couplées à l'anticorps ont été lavées 3 fois avec du PBS glacé, remises en suspension dans 300 μ L de PBS, puis conservées à -20°C.

3.2.4 Préparation de billes couplées à l'anticorps anti-K(NQTGG)

336 µg d'anticorps anti-K(NQTGG) ont été incubés avec 168 µL de billes magnétiques PureProteome Protein A/G (2 µg d'anticorps pour chaque µl de billes) dans du PBS pendant 1h à 4°C sous rotation. Les billes saturées ont été lavées 2 fois avec 1 mL de triéthanolamine 200 mM à pH 8,3. Pour le couplage, 1,68 mL de DMP 5 mM dans du triéthanolamine 200 mM à pH 8,3 a été ajouté et l'échantillon a été incubé pendant 1h à température ambiante sous rotation. La réaction a été arrêtée en ajoutant 84 µL de Tris-HCl 1 M à pH 7,5 et en incubant l'échantillon pendant 30 minutes sous rotation. Les billes couplées à l'anticorps ont été lavées 3 fois avec du PBS glacé, remises en suspension dans 600 µL de PBS contenant 50% de glycérol, puis conservées à -20°C.

3.2.5 Immunopurification des peptides SUMOylés et ubiquitylés

3.2.5.1 Peptides ubiquitylés

Pour l'immunopurification des peptides ubiquitylés, les peptides séchés ont été reconstitués dans 1 mL de PBS et incubés avec 100 µL de billes d'agarose couplées à l'anticorps anti-K(GG) dans du PBS pendant 2h à 4°C sous rotation. Le surnageant a été conservé pour l'immunopurification des peptides SUMOylés. Les billes couplées à l'anticorps anti-K(GG) ont été lavées 2 fois avec 1 mL de tampon de purification (MOPS/NaOH 50 mM, Na₂HP0₄ 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2) et 3 fois avec 1 mL d'eau glacée. Les peptides ubiquitylés ont été élués 2 fois avec 55 µL d'acide formique à 0,2% et filtrés à travers un tube avec des pores de 0,45 µm de diamètre. Les peptides élués ont été séchés dans un SpeedVac et conservés à -80°C pour leur analyse par spectrométrie de masse.

3.2.5.2 Peptides SUMOylés

Pour l'immunopurification des peptides SUMOylés, les surnageants de l'immunopurification des peptides ubiquitylés ont été incubés avec les billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-K(NQTGG) à un ratio de 1:2 (poids/poids) (anticorps:peptides) pendant 1h à 4°C sous rotation. Les billes couplées à l'anticorps anti-K(NQTGG) ont été lavées 3 fois avec 1 mL de PBS, 2 fois avec 1 mL de PBS 0,1X et 1 fois avec de l'eau glacée. Les peptides SUMOylés ont été élués 3 fois avec 200 µl d'acide formique à 0,2% et filtrés à

travers un tube avec des pores de 0,45 µm de diamètre. Les peptides élués ont été séchés dans SpeedVac et conservés à -80°C.

3.2.6 Fractionnement des peptides SUMOylés

Les colonnes chromatographiques SCX (strong cation exchange) ont été préparées en plaçant 3 disques de membrane SCX dans des embouts de pipette de 200 µL. Les peptides ont été reconstitués dans de l'eau contenant 1% de TFA et chargés sur les colonnes SCX conditionnées. Les peptides ont été élués avec 125, 175, 250, 350, 750 et 1500 mM d'acétate d'ammonium dans 20% d'acétonitrile et 0,2% d'acide formique afin d'obtenir 6 fractions. Les peptides ont été séchés dans un SpeedVac et conservés à -80°C pour leur analyse par spectrométrie de masse.

3.2.7 Purification des peptides phosphorylés

La précipitation des protéines a été réalisée en incubant 20 mL des surnageant de la purification d'affinité au NiNTA dans 5 mL d'acide trichloroacétique pendant 16h à 4°C sous rotation. Les culots ont été lavés 3 fois avec 2 mL d'acétone et remis en suspension dans une solution composée de guanidinium 6 M, Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM à pH 8,0. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. La réduction et l'alkylation des protéines a été effectuée en ajoutant du 2-chloroacétamide à une concentration finale de 20 mM et du 2-mercaptoéthanol à une concentration finale de 5 mM. Les échantillons ont été dilués 8 fois avec une solution composée de bicarbonate d'ammonium 50 mM. La digestion a été réalisée en ajoutant de la trypsine à un ratio de 1:20 (poids/poids) (trypsine:protéines) et en incubant les protéines et la trypsine pendant 16h à 37°C sous rotation. Les échantillons ont été dessalés sur des cartouches à phase inverse selon les instructions du fabricant avant d'être séchés dans un SpeedVac. Les échantillons ont été reconstitués dans 300 µL d'une solution composée d'acide lactique 250 mM, de TFA 3% et d'acétonitrile 70%. Les échantillons ont été déposés sur des microcolonnes commerciales de TiO₂ (3 par réplicat, soit 9 au total) préalablement conditionnées avec 100 µL d'une solution de TFA 3% et d'acétonitrile 70%. Les microcolonnes de TiO₂ ont été lavées 1 fois avec 100 µL d'une solution composée d'acide lactique 250 mM, de TFA 3% et d'acétonitrile 70% et 1

fois avec 200 µL d'une solution de TFA 3% et d'acétonitrile 70%. Les peptides ont été élués avec 200 µL de NH₄OH 1% à pH 10,5 et à nouveau avec 100 µL supplémentaires avant d'être séchés dans un SpeedVac et stockés à -80°C pour leur analyse par spectrométrie de masse.

3.2.8 Analyse par spectrométrie de masse

Les peptides ont été reconstitués dans de l'eau contenant 0,2% d'acide formique, puis analysés par LC-MS/MS en utilisant un spectromètre de masse Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific). Les échantillons ont été séparés sur une colonne analytique de C18 de 150 µm de diamètre interne et de 20 cm de longueur. La séparation a été effectuée en 120 minutes à un débit de 600 nL/min avec un gradient linéaire allant de 5 à 30 % d'acétonitrile avec 0,2% d'acide formique. Les spectres MS ont été acquis dans la gamme m/z 350-1200 à une résolution de 120 000. Le temps d'injection maximal était de 50 ms. Les spectres MS/MS ont été acquis en mode HCD avec une énergie de collision normalisée de 25 et une résolution de 30 000. Le temps d'injection maximal était de 1000 ms. Le seuil pour déclencher l'acquisition des spectres MS/MS a été fixé à 4E3.

3.2.9 Traitement des données

L'identification des peptides a été réalisée à l'aide de la version 1.5.5.1 du logiciel MaxQuant. La base de données Uniprot publiée le 10 mars 2015 a été utilisée. Le nombre maximal de sites de clivage manqués pour la trypsine a été fixé à 2. La carbamydométhylation a été définie comme une modification fixe. L'acétylation à l'extrémité N-terminale, la phosphorylation, l'oxydation, la désamination, l'ubiquitination et la SUMOylation ont été définies comme modifications variables. Le taux de faux positifs a été défini à $\leq 1\%$ en utilisant une base de données *target-decoy*. Les sites de SUMOylation, de phosphorylation et d'ubiquitination avec une probabilité de localisation supérieure à 0,75 ont été retenus. Seuls les sites identifiés dans les 3 réplicats biologiques ont été retenus. Les sites avec un $\log_2FC(ATO/Contrôle)$ de < -1 ou > 1 et une p-value $< 0,05$ ont été désignés comme significativement régulés.

3.3 Purification d'affinité au NiNTA

3.3.1 Cellules utilisées pour réaliser l'essai caspase

Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS glacé, lysées dans un tampon de lyse dénaturant (urée 8 M, NaH_2PO_4 50 mM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazole 20 mM à pH 8,0) puis soniquées. Un total de 5 mg de protéine a été incubé avec 100 μl de billes de NiNTA pendant 16h à 4°C sous rotation. Les billes ont été lavées 5 fois avec 1 mL de tampon de lyse dénaturant. Les billes ont été incubées 3 fois avec 200 μL de tampon d'élution dénaturant (urée 8 M, NaH_2PO_4 50 mM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, 2-chloroacétamide 20 mM, TCEP 1 mM, imidazole 500 mM à pH 8,0) pendant 15 minutes pour éluer les protéines. Les échantillons ont été concentrés à 100 μl avec un filtre à centrifuger (30 kDa), puis dilués à 1 mL dans un tampon natif (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, Triton à 1% à pH 8,0).

3.4.2 Cellules traitées à l'ATO

Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS glacé, lysées dans un tampon de lyse dénaturant (urée 8 M, NaH_2PO_4 50 mM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazole 20 mM, pH 8), puis soniquées. La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. Pour chaque condition, un total de 3 mg de protéines a été incubé avec 60 μL de billes de NiNTA pendant 16h à 4°C sous rotation. Les billes ont été lavées 5 fois avec 1 mL de tampon de lyse dénaturant. Les billes ont été incubées 3 fois avec 200 μL de tampon d'élution dénaturant (urée 8 M, NaH_2PO_4 50 mM, Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, 2-chloroacétamide 20 mM, TCEP 1 mM, imidazole 500 mM, pH 8) pendant 15 minutes pour éluer les protéines.

3.6 Essai caspase

3.6.1 Optimisation des conditions de l'essai cassât

La caspase-3 a été incubée dans un tampon recommandé par le fournisseur (50mM HEPES, NaCl 50 mM, CHAPS 0,1%, EDTA 10 mM, glycérol 5% à pH 7,2) avec du DTT 10

mM (tampon caspase) pendant 15 minutes à 37°C, puis ajoutée aux solutions indiquées dans une plaque à 96 puits. Les solutions de Triton contiennent du Tris-HCl (25 mM), du NaCl (150 mM) et du Triton aux concentrations indiquées (pH 8,0). Les solutions de CHAPS contiennent du Tris-HCl (25 mM), du NaCl (150 mM) et du CHAPS aux concentrations indiquées (pH 8,0). Les solutions d'urée contiennent du Tris-HCl (25 mM), du NaCl (150 mM), du Triton (1%) et de l'urée aux concentrations indiquées (pH 8,0). Un substrat synthétique de la caspase-3 (Ac-DEVD-pNA) était également ajouté aux solutions. Ce substrat, dont la séquence est basée sur le site de clivage de PARP1 par la caspase-3, colore la solution une fois clivé. Les plaques ont été incubées pendant 2h à 37°C. L'absorbance a été mesurée à 405 nm et correspond à l'activité enzymatique de la caspase-3.

3.6.2 Essai caspase sur les protéines SUMOylées

Les enzymes (SENP1, SENP2 et caspase-3) ont été incubées avec du DTT 10 mM pendant 15 minutes à 37°C. Un échantillon (15 µL) de protéines SUMO purifiées par NiNTA a été incubé avec 1 µg de SENP1 et 1 µg de SENP2 pendant 1h à 37°C. L'échantillon a été supplémenté avec du 2-chloroacétamide à une concentration finale de 20 mM et incubé 30 minutes à 37°C afin d'inactiver les protéines SENPs. L'échantillon a ensuite été supplémenté avec du DTT jusqu'à une concentration finale de 40 mM et incubé pendant 30 minutes à 37°C afin de neutraliser le 2-chloroacétamide n'ayant pas réagi avec les protéines. Les échantillons ont été incubés avec 0,5 U de caspase-3 pendant 1h à 37°C. La réaction a été arrêtée par l'addition d'un volume égal de LAEMMLI 2X et l'échantillon a été conservé à -20°C avant l'analyse par immunobuvardage. Un autre échantillon (15 µL) de protéines SUMO purifiées par NiNTA a été incubé avec 0,5 U de caspase-3 pendant 1h à 37°C. L'échantillon a été incubé pendant 10 minutes à 100°C avant l'addition de 2-chloroacétamide à une concentration finale de 20 mM et une incubation de 30 minutes à 37°C afin d'inactiver la caspase-3. Ensuite, l'échantillon a été supplémenté avec du DTT jusqu'à une concentration finale de 40 mM et incubé pendant 30 minutes à 37°C. L'échantillon a été incubé avec 1 µg de SENP1 et 1 µg de SENP2 pendant 1h à 37°C. La réaction a été arrêtée par l'addition d'un volume égal de LAEMMLI 2X et l'échantillon a été conservé à -20°C avant l'analyse par immunobuvardage.

3.7 Immunobuvardage

Les échantillons ont été bouillis dans du tampon LAEMMLI pendant 10 minutes et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE avec gradient de 4 à 12% avant d'être transférées sur des membranes de nitrocellulose. Le blocage a été effectué en incubant les membranes avec du lait en poudre écrémé à 5% dans du TBST pendant 1h à température ambiante. Les membranes ont été lavées 3 fois avec du TBST pendant 10 minutes et incubées avec des anticorps primaires pendant 16h à 4°C. Les membranes ont été lavées 3 fois avec du TBST pendant 10 minutes et incubées avec un anticorps secondaire couplé à la HRP pendant 2h à température ambiante. La détection des anticorps secondaires a été réalisée par ECL.

4. Résultats

4.1 Optimisation des conditions pour le traitement des cellules

Afin de mesurer les changements de SUMOylation, de phosphorylation et d'ubiquitination en réponse à l'ATO, nous avons utilisé une méthode de protéomique quantitative qui permet l'enrichissement des différents peptides modifiés à partir d'un seul échantillon biologique. Avant de réaliser cette expérience, nous avons d'abord déterminé les conditions optimales pour le traitement des cellules à l'ATO. Pour ce faire, nous avons traité un groupe de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 avec 1 μ M d'ATO pour différentes durées et nous avons traité un autre groupe de cellules avec différentes concentrations d'ATO pour une durée de quatre heures. Nous avons ensuite fait l'analyse des lysats cellulaires par immunobuvardage à l'aide d'anticorps dirigés contre PML et SUMO-2/3. Ainsi, nous avons pu observer une augmentation puis une diminution de la SUMOylation de PML et de la SUMOylation globale en réponse à l'ATO en fonction du temps (Figures 11A et 11B). Nous avons également pu observer une augmentation de la SUMOylation globale avec l'augmentation de la concentration d'ATO utilisée (Figure 11C).

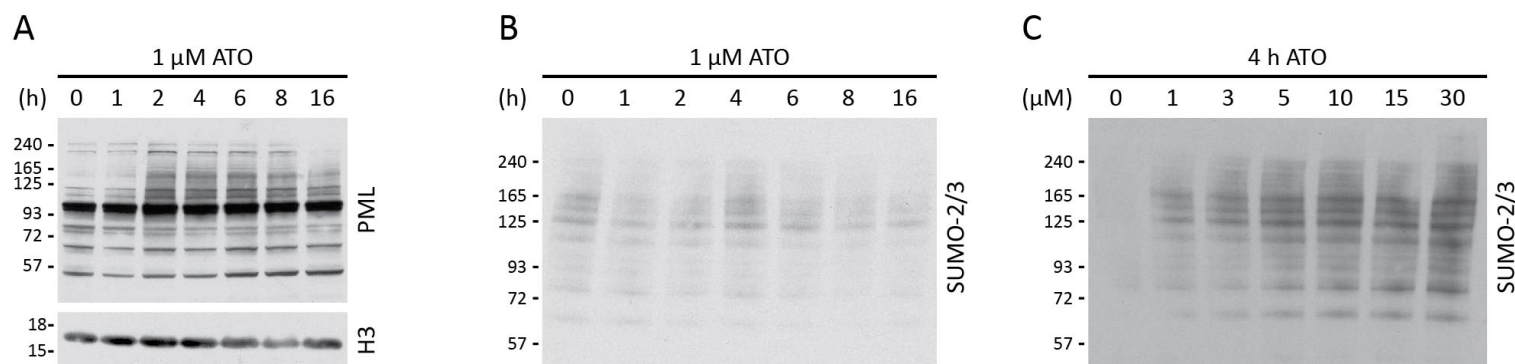


Figure 11. Détermination des conditions optimales pour l'expérience de spectrométrie de masse à grande échelle. (A) Immunobuvardage avec les anticorps contre PML et l'histone H3 d'un extrait cellulaire total de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 1 μ M d'ATO pendant les durées indiquées. (B) Immunobuvardage avec l'anticorps contre SUMO-2/3 d'un extrait cellulaire total de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 1 μ M d'ATO pendant les durées indiquées. (C) Immunobuvardage avec un anticorps contre SUMO-2/3 de l'extrait cellulaire total de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec l'ATO pendant 4h aux concentrations indiquées.

4.2 Aperçu de l'expérience de spectrométrie de masse

À la lumière de ces résultats, nous avons choisi de réaliser notre expérience à grande échelle en comparant 1 μ M et 10 μ M d'ATO pour un temps de traitement de quatre heures (Figure 12). Des cellules HEK293 exprimant de manière stable le mutant de SUMO3 (6xHis-SUMO3-Q87R/Q88N) ont été cultivées dans des milieux *light*, *medium* et *heavy* contenant des résidus lysine et arginine marqués avec des isotopes stables. Le milieu *medium* contient de la lysine D₄ et de l'arginine ¹³C₆ et le milieu *heavy* contient de la lysine ¹³C₆¹⁵N₂ et de l'arginine ¹³C₆¹⁵N₄. Les cellules ont été non traitées, traitées avec 1 μ M d'ATO ou traitées avec 10 μ M d'ATO. L'expérience a été réalisée pour trois réplicats biologiques. Après la culture et le traitement des cellules, les protéines des différentes conditions ont été extraites et combinées dans un rapport 1:1:1. Les protéines SUMOylées ont été enrichies sur une colonne de NiNTA avant la digestion à la trypsine, laissant sur les peptides SUMOylés un résidu de cinq acides aminés (NQTGG) et sur les peptides ubiquitylés un résidu de deux acides aminés (GG). L'immunopurification des peptides ubiquitylés a été effectuée après la purification d'affinité

au NiNTA avec un anticorps disponible commercialement capable de reconnaître le résidu GG. Le surnageant de cette première immunopurification a été utilisé pour enrichir les peptides SUMOylés avec un anticorps personnalisé, développé dans notre laboratoire (30), reconnaissant le résidu NQTGG. Les peptides phosphorylés ont été enrichis à partir du surnageant de la purification d'affinité au NiNTA après la digestion par la trypsine en utilisant une colonne de TiO₂. Les échantillons SUMOylés ont été fractionnés par chromatographie échangeuse de cations avant l'injection de tous les peptides en LC-MS/MS et l'analyse des données (Figure 12).

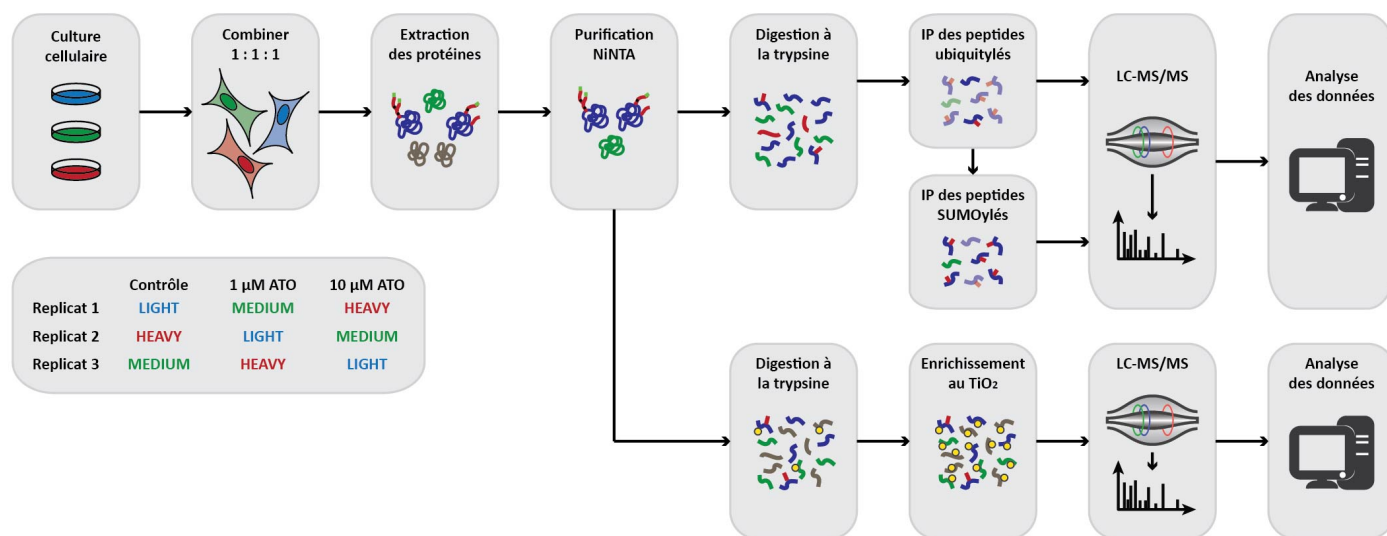


Figure 12. Aperçu de la stratégie utilisée pour enrichir et analyser les peptides SUMOylés, phosphorylés et ubiquitylés. Les peptides issus de la digestion des protéines SUMOylées après la purification d'affinité au NiNTA ont été soumis à une première immunopurification en utilisant l'anticorps anti-K-(GG) afin de purifier les peptides ubiquitylés. Le surnageant de cet enrichissement a été soumis à une deuxième immunopurification en utilisant l'anticorps anti-K-(NQTGG) afin de purifier les peptides SUMOylés. Les peptides phosphorylés ont été purifiés à partir du surnageant de la purification d'affinité au NiNTA en utilisant des colonnes de TiO₂. Les échantillons SUMOylés ont été fractionnés en utilisant des colonnes SCX. L'ensemble des éluats résultants ont été injectés séparément sur le système LC-MS/MS.

4.3 Sites et protéines identifiées par spectrométrie de masse

À l'aide de la stratégie utilisée, nous avons pu identifier, en réponse à 1 μM d'ATO, 909 sites SUMOylés sur 494 protéines, 3078 sites phosphorylés sur 1389 protéines et 93 sites ubiquitylés sur 45 protéines (Figure 13). En réponse à 10 μM d'ATO, nous avons pu identifier 922 sites SUMOylés sur 500 protéines, 3074 sites phosphorylés sur 1385 protéines et 94 sites ubiquitylés sur 47 protéines (Figure 13). Le chevauchement entre les différents réplicats varie entre 37 et 65 %.

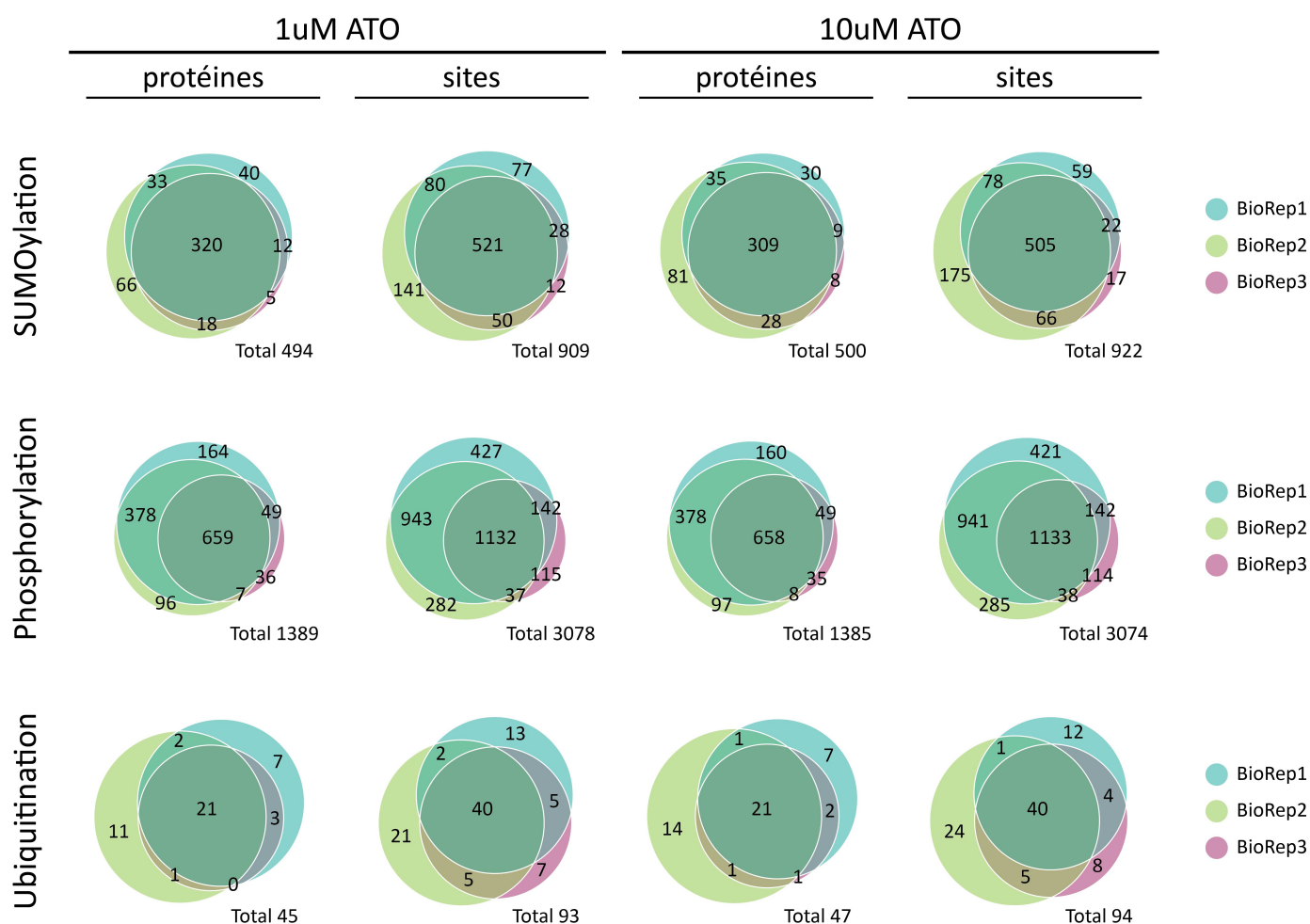


Figure 13. Nombre de protéines et de sites identifiés dans chacun des trois réplicats biologiques en réponse à 1 μM et 10 μM d'ATO. Le premier réplicat biologique est représenté en bleu, le deuxième en vert et le troisième en violet.

4.4 Analyse quantitative

Parmi tous les sites identifiés, nous avons sélectionné ceux présents dans les trois réplicats biologiques. Ainsi, nous avons identifié, au total, 525 sites SUMOylés sur 314 protéines (Figures 14A et 14D), 1135 sites phosphorylés sur 630 protéines (Figures 14B et 14E) et 40 sites ubiquitylés sur 21 protéines (Figures 14C et 14F), présents dans les trois réplicats biologiques, en réponse à 1 μ M et 10 μ M d'ATO. Nous avons ensuite sélectionné, comme étant régulés de manière significative, les sites avec un changement d'expression diminué d'au moins 2 fois ($\log_2FC < -1$) ou augmenté d'au moins 2 fois ($\log_2FC > 1$) lorsque comparé au contrôle et dont la p-value est inférieure à 0,05 (p-value < 0,05). Ainsi, 80 sites de SUMOylation sont régulés à la hausse et 47 sites sont régulés à la baisse, 24 sites de phosphorylation sont régulés à la hausse et 35 sites sont régulés à la baisse et 17 sites d'ubiquitination sont régulés à la hausse et 7 sites sont régulés à la baisse. Comme attendu, davantage de sites sont régulés en réponse à 10 μ M d'ATO par rapport à 1 μ M d'ATO. Nous avons également observé que tous les sites SUMOylés régulés en réponse à la faible dose le sont également en réponse à la forte dose. Quatre sites de SUMOylation ont été identifiés comme étant significativement régulés sur PML, soit K380, K394, K490 et K497. Ces sites font, d'ailleurs, partie des sites présentant les changements de SUMOylation les plus importants et la SUMOylation de K490 est essentielle au recrutement de partenaires protéiques au sein des corps nucléaires PML (128, 129). De plus, la régulation de certaines protéines reflète les changements d'activité d'enzymes rapportées comme étant régulées en réponse à l'ATO. Ainsi, des sites de phosphorylation ont été identifiés sur ACIN1 et CDK2, deux substrats de la kinase Akt, dont l'inactivation par l'ATO est rapportée dans la littérature (87, 130-132). Les sites identifiés montrent une diminution, mais ne sont toutefois pas significativement régulés. La liste des tous les sites régulés de façon significative se trouve en annexe (Tableaux I, II, III, IV, V et VI).

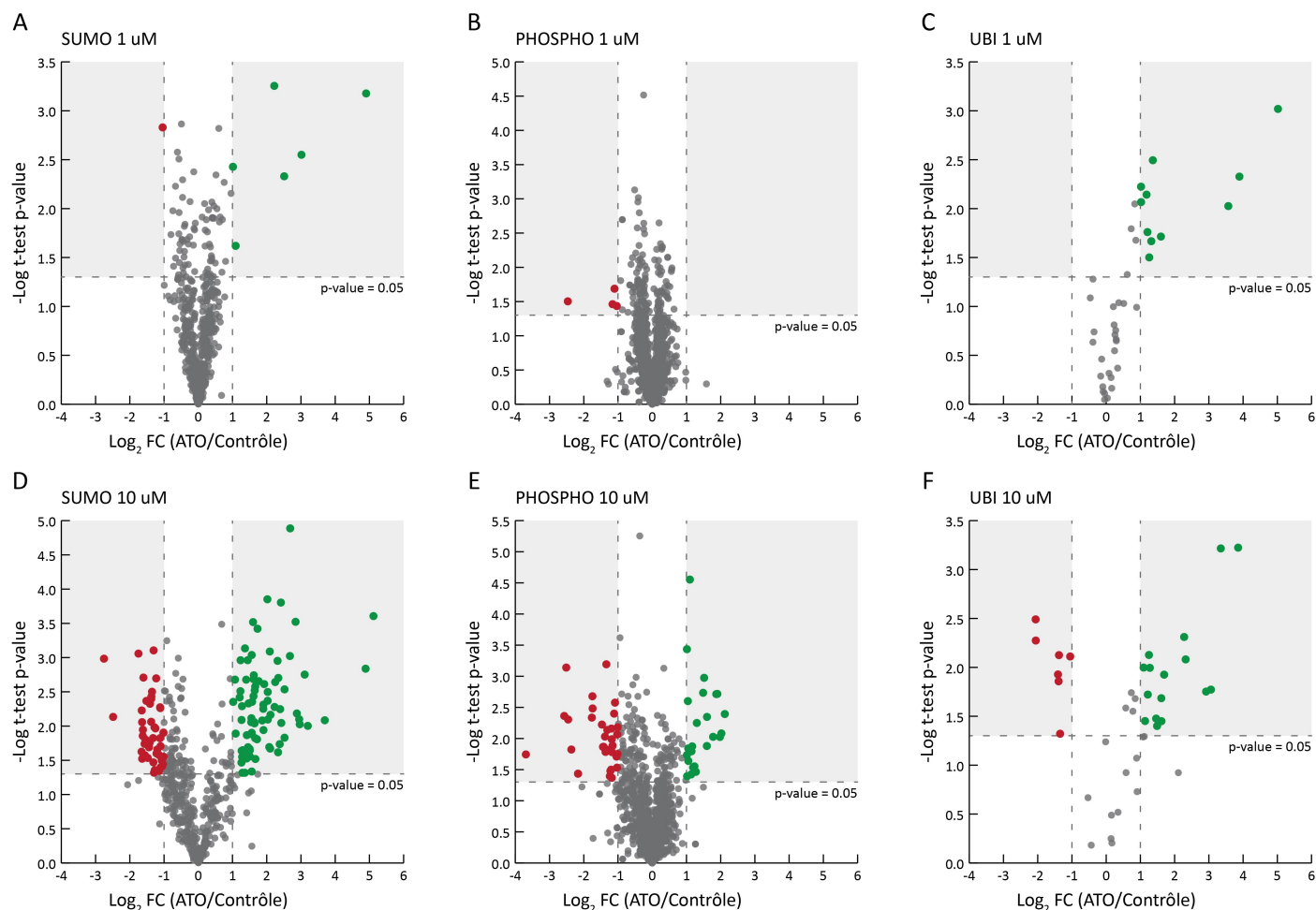


Figure 14. Analyse quantitative de la régulation de la SUMOylation, de la phosphorylation et de l'ubiquitination en réponse à l'ATO. *Volcano plots* montrant les changements dans l'abondance des peptides SUMOylés, phosphorylés et ubiquitylés après 4h de traitement avec 1 μ M ou 10 μ M d'ATO. Les points en rouge (régulés négativement) et les points en vert (régulés positivement) représentent les sites retrouvés dans les trois réplicats biologiques qui sont significativement régulés et qui ont une p-value < 0,05.

4.5 Réseau d'interactions protéine-protéine

Afin d'explorer les liens qui unissent les protéines SUMOylées, phosphorylées et ubiquitylées que nous avons identifiées dans notre expérience de spectrométrie de masse à grande échelle, nous avons effectué une analyse STRING, en utilisant uniquement les

protéines avec un site régulé de manière significative (Figure 15). Le réseau résultant montre un haut degré d'interconnectivité entre les protéines de notre jeu de données. En effet, 90 des 148 protéines régulées significativement interagissent avec au moins une autre des protéines régulées, et 86 protéines se retrouvent dans le noyau de protéines représenté à la figure 15.

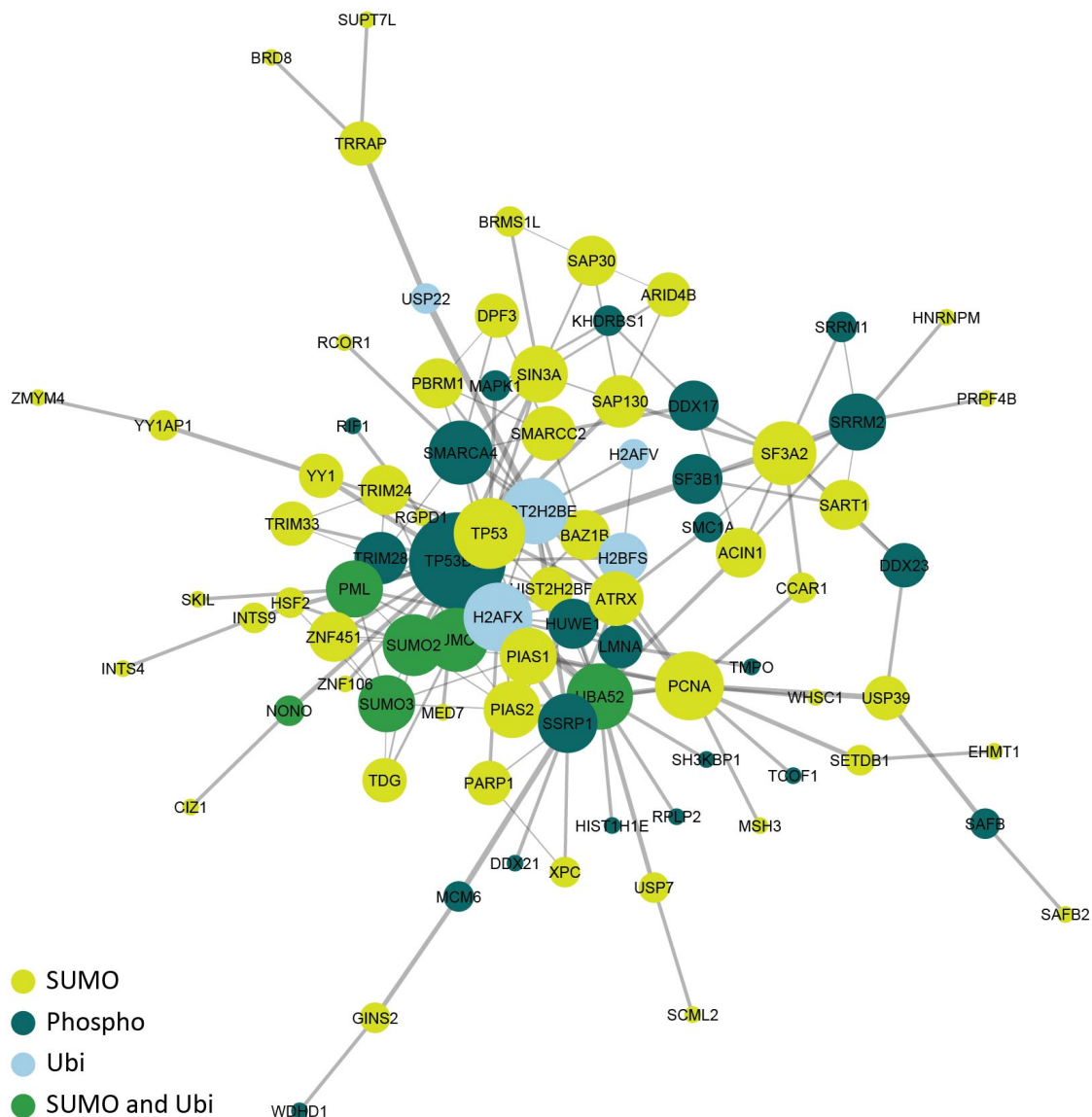


Figure 15. Les protéines avec un site SUMOylé, phosphorylé ou ubiquitylé régulé de manière significative montrent un degré élevé d'interconnectivité. Réseau d'interactions protéine-protéine réalisé à l'aide de STRING pour les protéines sur lesquelles un site de SUMOylation, de phosphorylation ou d'ubiquitination régulé de manière significative a été identifié. Le réseau a été créé avec un score moyen pour la confiance des interactions et en utilisant uniquement les preuves expérimentales comme source d'interactions. L'aspect visuel du réseau a été travaillé à l'aide de Cytoscape. Les protéines non regroupées ou regroupées avec une seule autre protéine ont été exclues. Les protéines identifiées comme étant uniquement SUMOylées sont représentées en vert clair, uniquement phosphorylées en bleu foncé, uniquement ubiquitylées en bleu clair et celles identifiées à la fois comme SUMOylées et ubiquitylées en vert foncé. La taille de chaque noeud représente le nombre de partenaires d'interaction.

4.6 Poly-SUMOylation et poly-ubiquitination

En plus d'être fortement liées les unes aux autres, certaines protéines régulées sont à la fois SUMOylées et ubiquitylées. La majorité de ces protéines sont en fait les protéines SUMO (SUMO1, SUMO2 et SUMO3) et l'ubiquitine (UBA52), mettant en évidence des événements de poly-SUMOylation, de poly-ubiquitination ou de formation de chaînes mixtes de protéines SUMO et d'ubiquitine (Figure 16). La poly-ubiquitination pourrait être associée à la dégradation des protéines dans les corps nucléaires PML. D'ailleurs, PML elle-même a été identifiée comme étant à la fois SUMOylée et ubiquitylée.

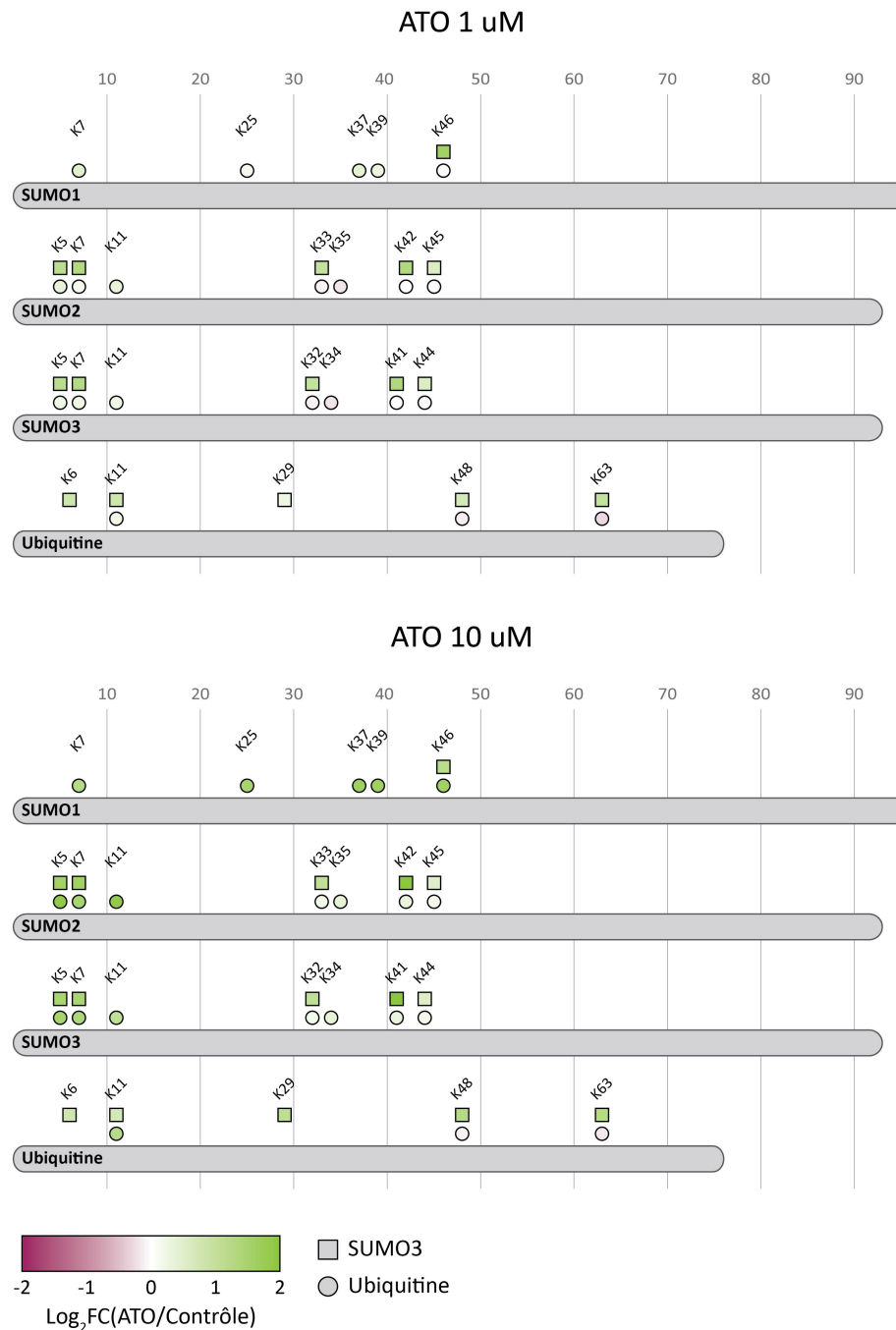


Figure 16. Sites de SUMOylation et d'ubiquitination significativement régulés identifiés sur SUMO1, SUMO2, SUMO3 et sur l'ubiquitine. Les sites de SUMOylation sont représentés par des carrés. Les sites d'ubiquitination sont représentés par des cercles. La couleur des carrés et des cercles est représentative de leur Log₂FC(ATO/Contrôle) selon l'échelle indiquée. Le vert représente une augmentation de la régulation et le rose une diminution de la régulation.

4.7 Analyse d'ontologie génique

Afin, encore une fois, d'avoir une meilleure compréhension de la nature des peptides SUMOylés, phosphorylés et ubiquitylés identifiés dans le projet, nous avons effectué une analyse des termes GO (gene ontology) enrichis à l'aide du logiciel DAVID, en utilisant, ici également, uniquement les protéines régulées de manière significative (Figure 17). Plusieurs termes enrichis identifiés sont associés à des rôles classiques de la SUMOylation, tels que la transcription, la modification de la chromatine et l'épissage. D'autres termes enrichis sont, quant à eux, plus spécifiques au traitement à l'ATO et étaient attendus, par exemple, la SUMOylation des protéines comme processus biologique et les corps nucléaires PML comme compartiment cellulaire. Certains termes intéressants et inattendus semblent également être liés au traitement, tels que la réparation de l'ADN. En effet, l'ATO induit un stress oxydatif dans les cellules, causant des dommages à l'ADN, expliquant la régulation des protéines impliquées dans sa réparation.

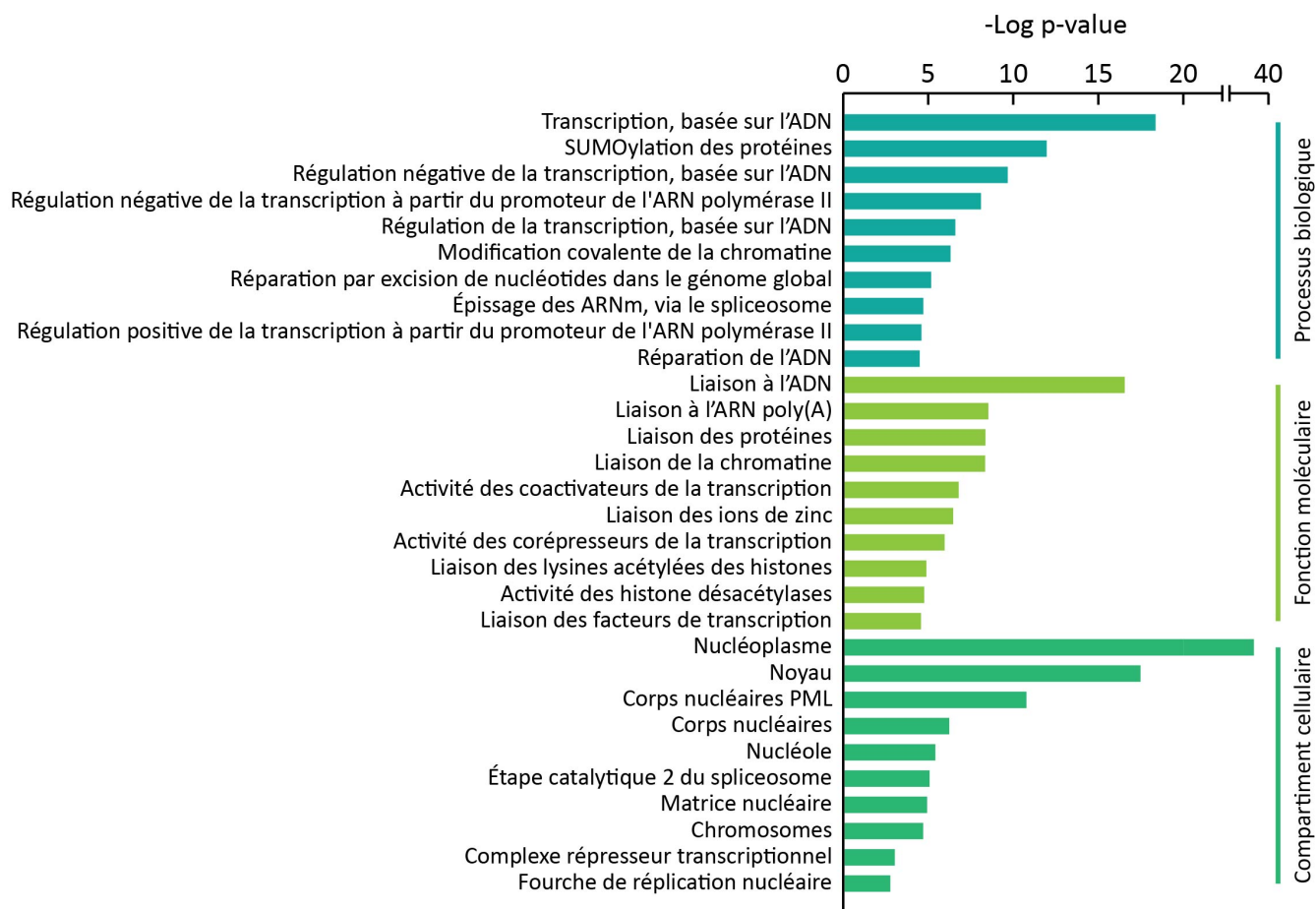


Figure 17. Les protéines avec un site SUMOylé, phosphorylé ou ubiquitylé significativement régulé sont impliquées dans la réparation de l'ADN. Termes GO d'une analyse effectuée à l'aide de DAVID comparant les protéines identifiées avec un site significativement régulé de SUMOylation, de phosphorylation ou d'ubiquitination au protéome humain. Les 10 termes les plus enrichis pour chacune des catégories (processus biologique, fonction moléculaire et compartiment cellulaire) sont indiqués.

4.8 Relations entre les modifications post-traductionnelles

Afin d'explorer les relations qui unissent les protéines identifiées dans notre expérience, nous avons voulu savoir si celles-ci étaient modifiées par plus d'une modification post-traductionnelle. Nous avons observé que 69 protéines étaient à la fois SUMOylées et

phosphorylées, 11 étaient à la fois SUMOylées et ubiquitylées, 2 étaient à la fois phosphorylées et ubiquitylées et 2 étaient à la fois SUMOylées, phosphorylées et ubiquitylées (Figure 18).

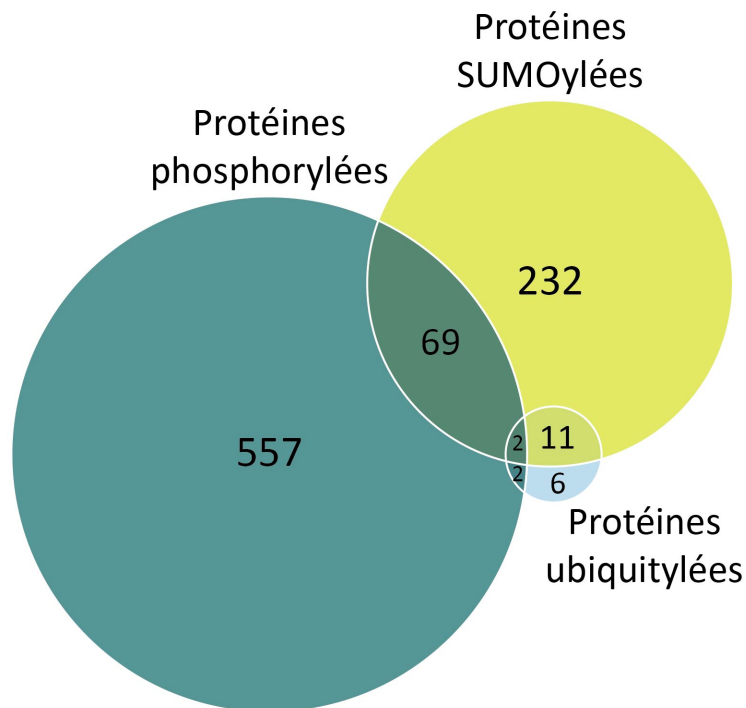


Figure 18. Chevauchement des protéines portant un site de SUMOylation, de phosphorylation ou d'ubiquitination. Représentation de l'ensemble des protéines sur lesquelles un site de modification a été identifié en réponse à l'ATO.

Nous nous sommes intéressés à SUMO1 et à TRIM28, puisque ce sont les deux protéines sur lesquelles nous avons identifié à la fois un site de SUMOylation, un site de phosphorylation et un site d'ubiquitination. Les sites identifiés sur les deux protéines sont représentés à la figure 19. La SUMOylation et l'ubiquitination de SUMO1 soulignent la présence d'évènements de poly-SUMOylation et de formation de chaînes mixtes d'UBLs. De plus, notre méthode permet l'identification des lysines SUMOylées par SUMO3, et le fait d'avoir identifié de tels sites sur SUMO1 suggère la formation de chaînes poly-SUMO composées de différents paralogues SUMO. Cependant, il est rapporté dans la littérature que SUMO1 termine habituellement ce type de chaînes. En effet, SUMO1 semble limiter

l'élongation des chaînes formées par SUMO2 et SUMO3 et est donc localisé à la fin de celles-ci (133). La phosphorylation de SUMO1 sur sa sérine à la position 2 est rapportée dans la littérature, mais son rôle demeure inconnu, bien qu'elle mette en évidence les divers niveaux de complexité qui caractérisent les modifications post-traductionnelles (134). Identifiée pour la première fois en 1996, TRIM28 régule l'expression de gènes cibles en interagissant avec de nombreux facteurs de transcription (135). La protéine est également impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN et la régulation de p53, en plus d'être surexprimée dans de nombreux cancers (136). De plus, elle a une activité E3 SUMO ligase et peut s'auto-SUMOyler (137). TRIM28 comprend le même motif RBCC/TRIM que celui retrouvé sur PML. Les fonctions associées aux modifications post-traductionnelles de la protéine demeurent peu caractérisées. Cependant, une étude a montré que la phosphorylation de TRIM28 à un résidu spécifique réprime sa SUMOylation (138). La SUMOylation semblerait également augmenter l'activité répressive de TRIM28 par rapport à la transcription de certains gènes (136). De plus, le site de phosphorylation que nous avons identifié sur la protéine se trouve à proximité d'une lysine que nous avons trouvée SUMOylée, mais les résidus ne font pas partie du motif de SUMOylation phospho-dépendant Ψ -K-X-E/D-X-X-pS-P. Les deux sites de phosphorylation que nous avons identifiés sur SUMO1 et TRIM28 ne sont pas significativement régulés, et ce, probablement en raison du temps de traitement à l'ATO de quatre heures. La phosphorylation est, effectivement, un événement plus rapide que la SUMOylation ou l'ubiquitination et un tel temps de traitement est possiblement trop long pour voir des changements significatifs en phosphorylation. Nous avons également représenté, à la figure 19, les sites de modification identifiés sur PML, puisqu'ils illustrent bien la relation qui peut unir la SUMOylation et l'ubiquitination. En réponse à l'ATO, PML est SUMOylée, puis les sites de poly-SUMOylation sont reconnus par une E3 ubiquitine ligase, RNF4, qui va catalyser la poly-ubiquitination de la protéine, ce qui mène à sa dégradation par le protéasome (139).

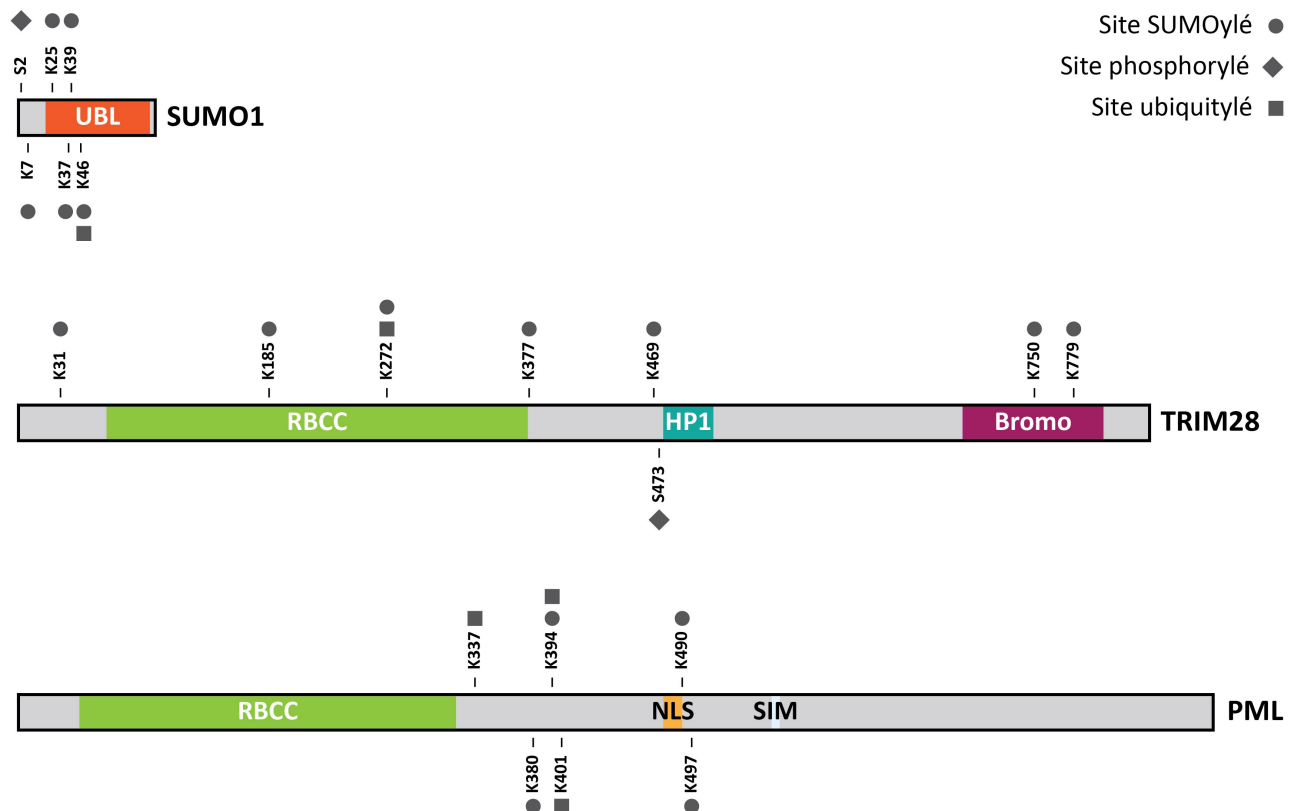


Figure 19. Relations entre les modifications post-traductionnelles sur quelques protéines d'intérêt. Distribution des sites de SUMOylation, de phosphorylation ou d'ubiquitination identifiés sur SUMO1, TRIM28 et PML en réponse à l'ATO.

4.9 SUMOylation de PARP1

Parmi toutes les protéines que nous avons identifiées dans notre expérience de protéomique à grande échelle, PARP1 est l'une des protéines sur lesquelles nous avons identifié un site de modification significativement régulé et qui est présente dans le réseau de protéines hautement connectées, en plus d'être impliquée dans la réparation de l'ADN. Nous nous sommes particulièrement intéressés à PARP1, car le traitement à l'ATO induit des dommages à l'ADN et cette protéine est impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN (102, 140). Des études récentes montrent également que l'utilisation d'inhibiteurs de PARP1 pourrait augmenter l'efficacité de l'ATO dans le traitement de certains types de cancer (106,

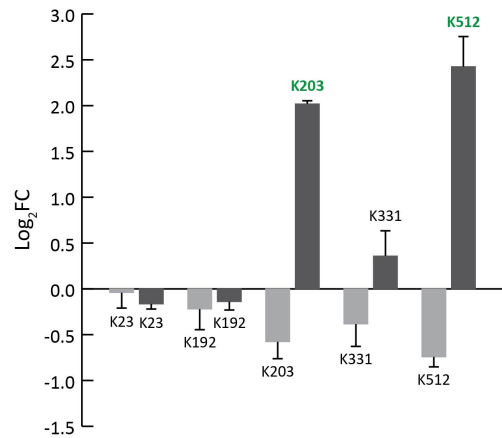
141). De plus, le clivage protéolytique de PARP1 est une des caractéristiques biochimiques de l'apoptose et la protéine est connue pour être clivée en réponse à l'ATO (108-110). Nous avons identifié cinq sites de SUMOylation sur PARP1, dont deux sont fortement régulés à la hausse (Figure 20A). Ces deux sites, avec les sites identifiés sur PML, sont parmi les sites présentant les changements de SUMOylation les plus importants. De plus, l'un de ces deux sites, K203, se trouve à proximité du site de clivage par la casapase-3 situé entre les résidus 214 et 215 (Figure 20B). Ce site semble également être conservé à travers les espèces (Figure 20C).

A

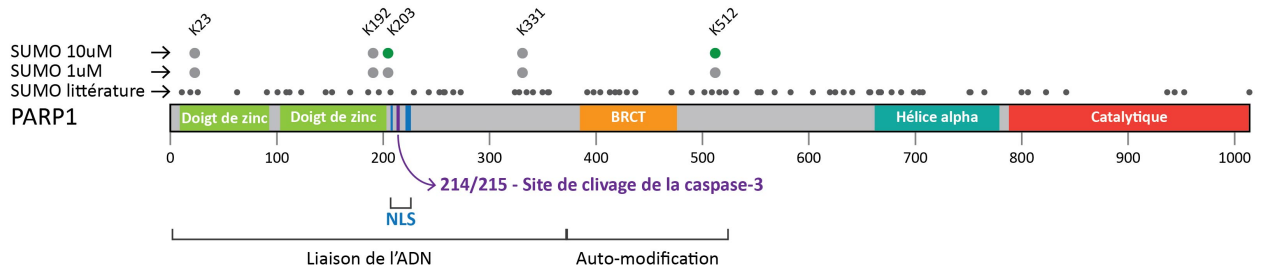
SUMO PARP1

■ Log₂FC(ATO 1uM/Contrôle)

■ Log₂FC(ATO 10uM/Contrôle)



B



C

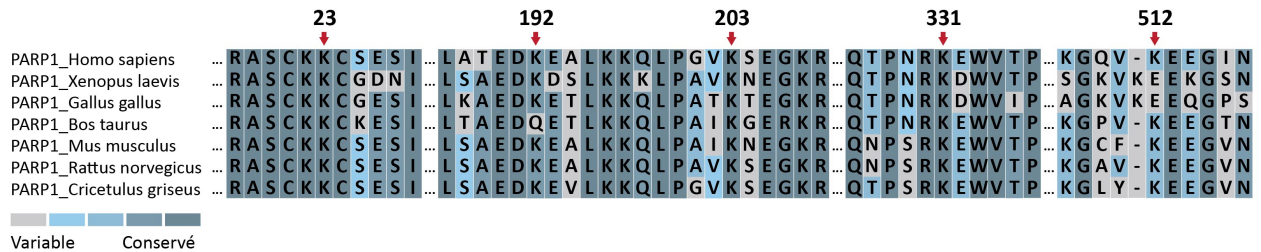


Figure 20. SUMOylation de PARP1 en réponse à l'ATO. (A) Log₂FC(ATO/Contrôle) des 5 sites SUMOylés identifiés sur PARP1 en réponse à 1 µM et 10 µM d'ATO avec l'écart type calculé à partir des trois réplicats biologiques. Les deux sites significativement régulés sont représentés en vert. (B) Distribution des sites de SUMOylation identifiés sur PARP1 en réponse à 1 µM et 10 µM d'ATO. Les sites de SUMOylation rapportés dans la littérature sont également présentés (142-144). Le site de clivage de la caspase-3 est représenté en violet. (C) Analyse d'alignement des séquences de quelques orthologues de PARP1.

4.10 Clivage protéolytique de PARP1 en réponse à l'ATO

Il est rapporté dans la littérature que PARP1 est clivée en réponse à l'ATO, comme mentionné précédemment, et nous avons tenté de reproduire ces résultats avec nos cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 en les traitant à l'ATO. Nous avons choisi de traiter les cellules avec 10 μ M d'ATO, puisque les sites de SUMOylation identifiés sur PARP1 en spectrométrie de masse étaient régulés de façon significative en réponse à cette concentration. Après le traitement des cellules, nous avons fait l'analyse du clivage de PARP1 par immunobuvardage, à l'aide d'anticorps dirigés contre PARP1 et contre la plus large des deux unités qui résultent du clivage de PARP1. Ainsi, nous avons observé que PARP1 était clivée suite à un long traitement avec 10 μ M d'ATO, soit à partir de 48 heures (Figure 21A). Nous avons également réalisé une purification d'affinité au NiNTA pour les temps de traitements de quatre et de 48 heures. Le temps de quatre heures correspond à celui utilisé pour l'expérience de protéomique à grande échelle, alors que le temps de 48 heures correspond à celui pour lequel il a été possible d'observer le clivage de PARP1 par immunobuvardage. Avant d'utiliser les anticorps contre PARP1 et PARP1 clivée, nous avons vérifié l'efficacité de la purification à l'aide de l'anticorps contre SUMO-2/3. Malgré qu'un certain nombre de protéines SUMOylées aient été trouvées dans le surnageant de la purification, un nombre satisfaisant de protéines est retrouvé dans l'élution (Figure 21B). Nous avons pu constater que la partie clivée de PARP1 est enrichie dans l'échantillon 48 heures, contrairement à l'échantillon quatre heures (Figure 21C). Le fait que PARP1 de pleine longueur et sa forme clivée aient été enrichies à partir de l'échantillon 48 heures signifie que certaines lysines de PARP1 sont toujours SUMOylées à ce stade. PARP1 est une protéine fortement SUMOylée, mais il est possible de penser que le site K203 pour lequel nous avons observé une augmentation de la SUMOylation à 4 heures soit dé-SUMOylé à 48 heures.

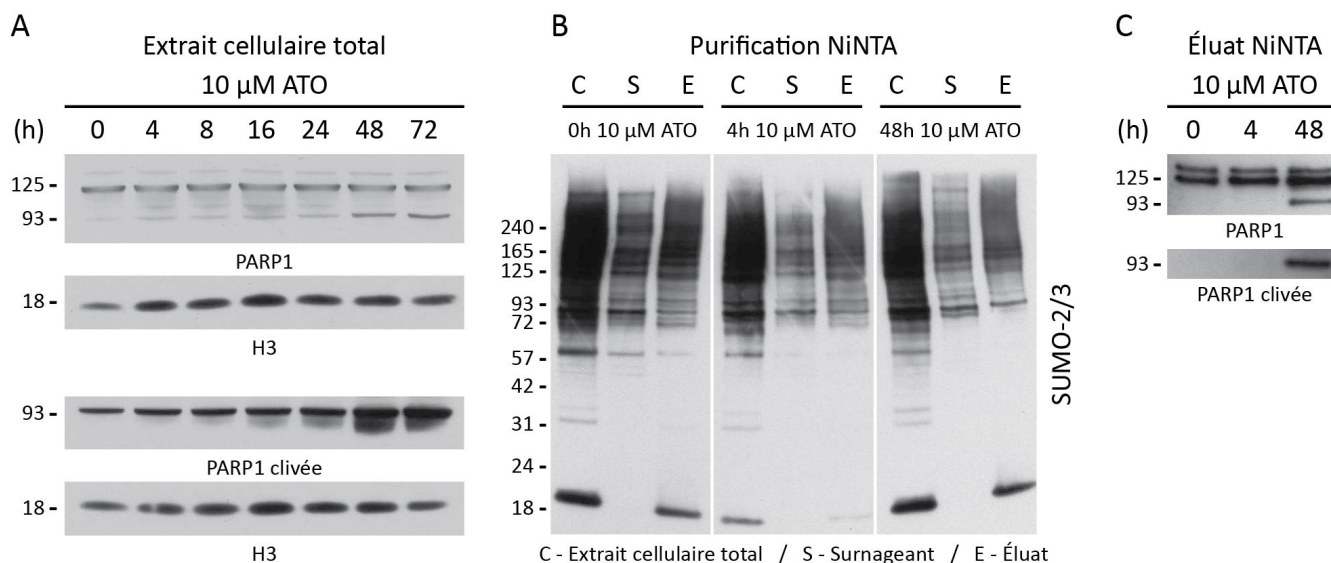


Figure 21. PARP1 est clivée en réponse à l'ATO à partir de 48h de traitement. (A) Immunobuvardage avec les anticorps contre PARP1, PARP1 clivée et l'histone H3 d'un extrait cellulaire total de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M d'ATO pendant les durées indiquées. (B) Immunobuvardage avec l'anticorps contre SUMO-2/3 de l'extrait cellulaire total, du surnageant et de l'éluat de la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M d'ATO pendant les durées indiquées. (C) Immunobuvardage avec les anticorps contre PARP1 et PARP1 clivée de l'éluat de la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M d'ATO pendant les durées indiquées.

4.11 Développement d'un essai caspase

Les protéines SUMO sont plutôt volumineuses par rapport aux autres groupes chimiques susceptibles de modifier les protéines, tels que les groupes acétyle ou phosphate. De plus, une étude récente suggère qu'une augmentation de la SUMOylation empêche la mort induite par la caspase-3 dans des cellules stressées (145). Nous nous sommes donc demandé si la SUMOylation de PARP1 sur le site K203 pourrait affecter le clivage de la protéine par la caspase-3. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un test *in vitro*, décrit à la figure 22, dans lequel un échantillon de protéines SUMOylées purifiées est d'abord séparé en deux parties égales. L'un des échantillons est incubé avec la caspase-3 active d'origine humaine, puis les protéines sont dé-SUMOylées par incubation avec les enzymes SENP1 et SENP2. Les

protéines du deuxième échantillon sont d'abord dé-SUMOylées avant d'être traitées avec la caspase-3. Toutes les protéines sont finalement soumises à une analyse par immunobuvardage. Entre les deux étapes de traitement enzymatique, du 2-chloroacétamide et du DTT sont ajoutés aux échantillons afin d'inactiver les enzymes. En effet, les trois enzymes utilisées, la caspase-3, SENP1 et SENP2, contiennent une cystéine au site actif, qui peut être inactivée par alkylation. L'échantillon d'abord traité avec la caspase-3 est également bouilli après incubation pour assurer l'inactivation complète de l'enzyme.

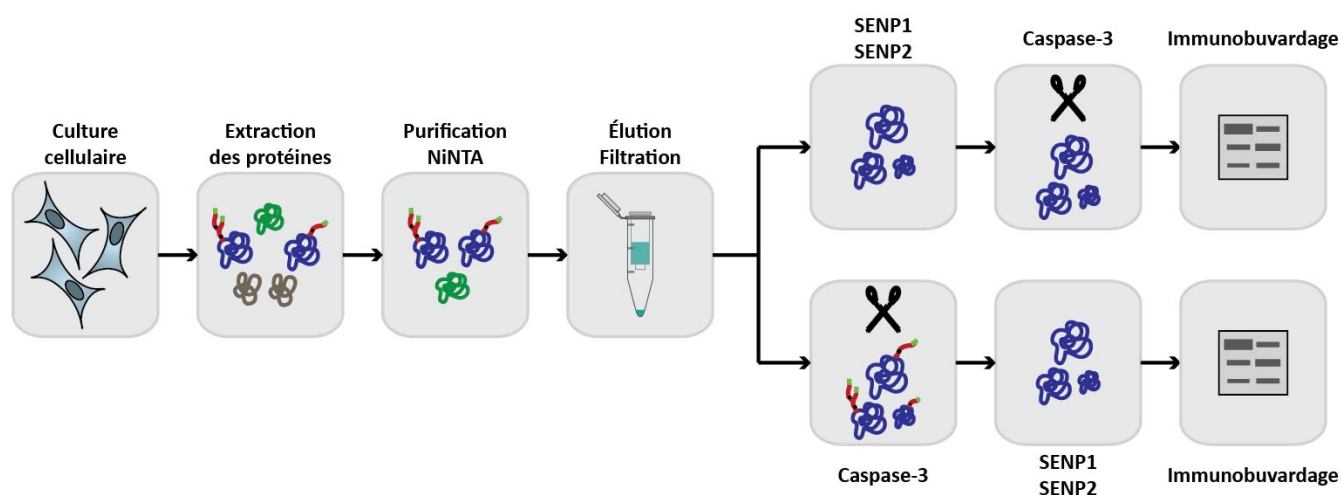


Figure 22. Aperçu de la stratégie utilisée afin d'étudier le rôle de la SUMOylation par rapport au clivage par la caspase-3. Une purification d'affinité au NiNTA a été effectuée à partir d'un lysat de cellules qui ont été traitées avec 10 μ M de MG132, un inhibiteur du protéasome, pendant 18h. Les protéines SUMOylées obtenues par purification ont été concentrées avant d'être soumises à l'essai caspase *in vitro* dans lequel les protéines sont séparées en deux échantillons. Le premier échantillon est d'abord dé-SUMOylé (traitement avec SENP1 et SENP2) avant d'être traité à la caspase-3. Le deuxième échantillon est d'abord traité à la caspase-3 avant d'être dé-SUMOylé. Du 2-chloroacétamide et du DTT sont ajoutés entre les deux étapes enzymatiques afin d'inactiver les premières enzymes ajoutées. Le deuxième échantillon est également bouilli pendant 10 minutes entre les deux étapes afin d'assurer une inactivation complète de la caspase-3. Les protéines sont finalement soumises à une analyse par immunobuvardage.

4.12 Optimisation des conditions pour l'essai caspase

Avant de l'appliquer à l'analyse d'échantillons biologiques, les conditions de l'essai caspase *in vitro* ont été optimisées. Pour ce faire, un substrat colorimétrique de la caspase-3 a été utilisé. Ce substrat, un court peptide sur lequel la nitroallinine est greffée, est basé sur la séquence de PARP1 et colore la solution dans lequel il se trouve suite à son clivage protéolytique par la caspase-3. La mesure de l'absorbance, à 405 nm, représente donc le niveau d'activité enzymatique de la caspase-3. Nous avons d'abord déterminé la quantité de caspase-3 à utiliser dans l'essai en incubant différentes quantités de celle-ci dans un tampon recommandé par le fournisseur de l'enzyme en présence du substrat colorimétrique (Figure 23A). La quantité est représentée en unité enzymatique (U). Ainsi, nous avons déterminé qu'une quantité de 0,5 U était suffisante pour l'obtention d'un signal adéquat. L'activité de la caspase-3 a ensuite été mesurée dans différents tampons afin de déterminer lequel utiliser pour l'essai (Figure 23B). Nous avons ainsi déterminé que le tampon contenant du Triton 1%, que nous utilisons habituellement pour resuspendre les protéines afin qu'elles se trouvent en conditions natives suite à une purification en conditions dénaturantes, était adéquat. La présence de Triton semble diminuer l'activité enzymatique de la caspase-3, puisqu'une concentration croissante de Triton occasionne une diminution du signal. Par contre, l'utilisation du CHAPS, un autre détergent, donne des résultats similaires. De plus, une concentration de 1% de Triton permet toujours à la caspase-3 d'être active. La présence d'urée dans la solution sur l'activité enzymatique a également été déterminée, puisque la lyse des cellules se fait dans un tampon contenant de l'urée (Figure 23C). Dans nos échantillons biologiques, la concentration finale en urée était d'environ 1M, puisque les échantillons lysés dans 8M ont été dilués environ 10 fois. Nous avons pu observer qu'une concentration d'environ 1M permet toujours une activité enzymatique de la caspase-3. Finalement, l'inactivation de la caspase-3 par l'ajout de 2-chloroacétamide/DTT et par ébullition de l'échantillon a été vérifiée et l'activité de l'enzyme ajoutée dans un échantillon ayant préalablement été traité au 2-chloroacétamide/DTT a également été mesurée (Figure 23D). De cette façon, nous avons pu observer que la caspase-3 était bel et bien inactivée par l'ajout de 2-chloroacétamide/DTT dans le tampon de Triton 1% et par ébullition de l'échantillon. De plus, la caspase-3 est bien active lorsqu'ajoutée à un échantillon traité auparavant au 2-

chloroacétamide/DTT. L'activité enzymatique semble, en fait, être augmentée dans ces conditions, par rapport à l'activité de l'enzyme dans le tampon recommandé par le fournisseur, probablement en raison de la concentration plus élevée de DTT dans l'échantillon.

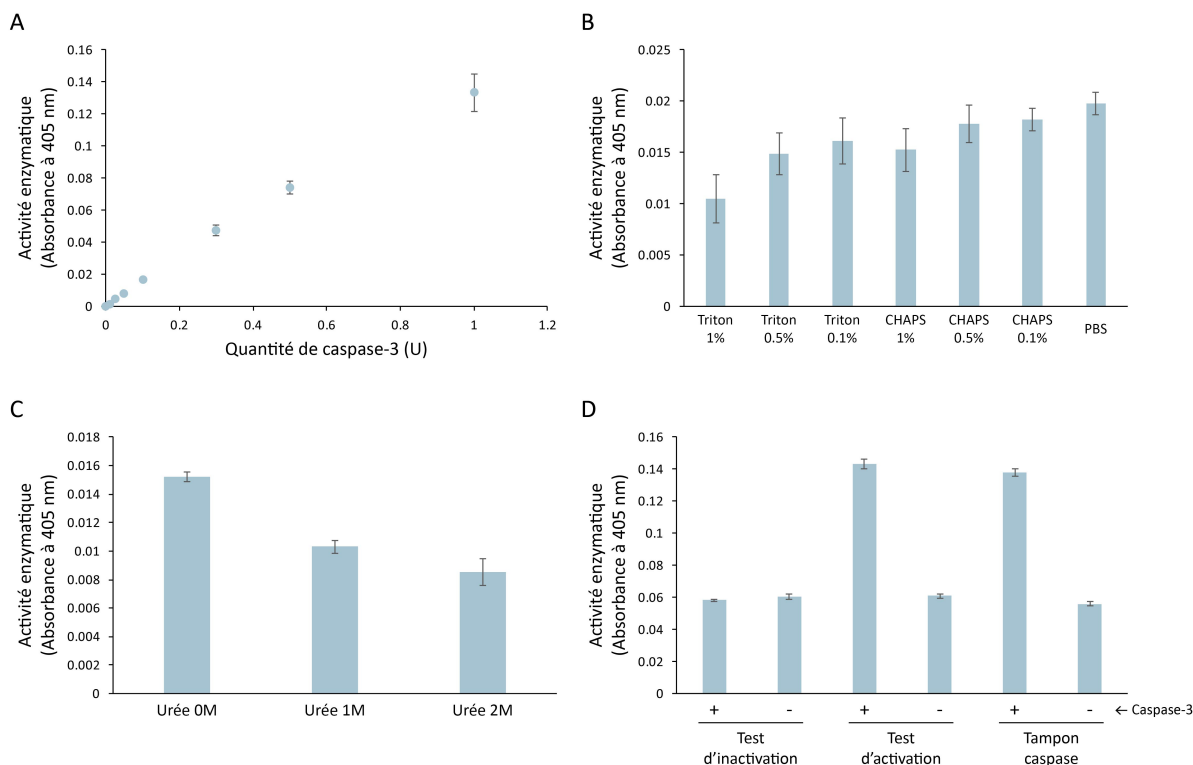


Figure 23. Détermination des conditions optimales pour l'essai caspase. (A) Les différentes quantités de caspase-3 ont été incubées avec un substrat colorimétrique dans un tampon recommandé par le fournisseur de l'enzyme pendant 2h à 37°C. L'absorbance a été lue à 405 nm. Le signal du blanc (échantillon sans caspase-3) a été soustrait au signal obtenu avec le substrat colorimétrique. (B) La caspase-3 a été incubée avec un substrat colorimétrique dans les différents tampons indiqués pendant 2h à 37°C. L'absorbance a été lue à 405 nm. Le signal du blanc (échantillon sans caspase-3) a été soustrait au signal obtenu avec le substrat colorimétrique. (C) La caspase-3 a été incubée avec un substrat colorimétrique dans un tampon de Triton 1% comprenant différentes concentrations d'urée pendant 2h à 37°C. L'absorbance a été lue à 405 nm. Le signal du blanc (échantillon sans caspase-3) a été soustrait au signal obtenu avec le substrat colorimétrique. (D) La caspase-3 a été incubée avec un substrat colorimétrique dans un tampon de Triton 1% après avoir été bouillie et traitée au 2-chloroacétamide (20 mM) et au DTT (40 mM) (test d'inactivité). La caspase-3 a été incubée sans (blanc) ou avec un substrat colorimétrique dans un tampon de Triton 1% qui contient du 2-chloroacétamide (20 mM) et du DTT (40 mM) (test d'activité). Le signal du blanc est représenté.

4.13 Effet de la SUMOylation sur le clivage de PARP1 *in vitro*

Une fois les conditions de l'essai optimisées, nous avons pu l'appliquer à l'analyse d'un échantillon biologique par immunobuvardage en utilisant les anticorps dirigés contre PARP1 et PARP1 clivée. Les résultats de l'essai caspase *in vitro* montrent que PARP1 est davantage clivée lorsque les protéines sont d'abord dé-SUMOylées avant d'être traitées avec la caspase-3 par rapport aux protéines qui ont d'abord été incubées avec la caspase-3 (Figure 24). Ainsi, la SUMOylation semble protéger PARP1 contre son clivage par la caspase-3.

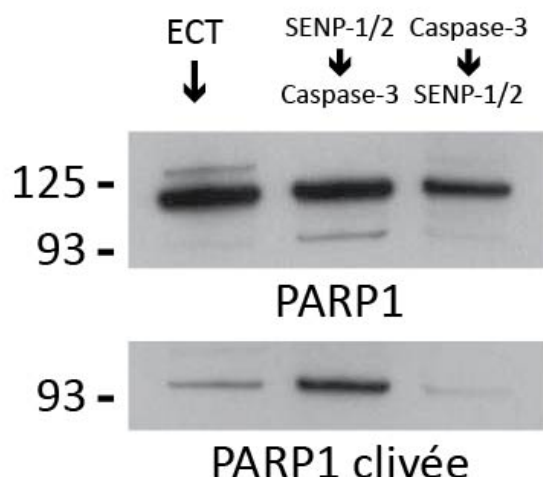


Figure 24. La SUMOylation protège PARP1 contre son clivage protéolytique *in vitro*. Immunobuvardage avec les anticorps contre PARP1 et PARP1 clivée de l'éluat de la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir ces cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h après l'essai caspase *in vitro*. ECT : Extrait cellulaire total.

4.14 Vérification des conditions pour l'essai caspase

Afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus pour l'essai caspase effectué sur l'échantillon biologique, nous avons vérifié l'efficacité de la purification d'affinité au NiNTA par immunobuvardage avec l'anticorps dirigé contre SUMO-2/3. La purification semble avoir été efficace, puisqu'une quantité minime de protéines SUMOylées se retrouve dans le

survenant de la purification (Figure 25A). De plus, un nombre satisfaisant de protéines SUMOylées est retrouvé dans l'éluat et dans l'éluat resuspendu dans un tampon natif, lorsque comparé à l'extrait cellulaire total (Figure 25A). Nous avons également vérifié que la dé-SUMOylation des protéines était complète par immunobuvardage avec l'anticorps contre SUMO-2/3 et que les deux échantillons étaient donc comparables. Un immunobuvardage des échantillons de l'essai a révélé que le traitement à la SENP1 et à la SENP2 était efficace, puisqu'aucune protéine SUMOylée n'apparaît sur la membrane et que la seule bande présente correspond à SUMO libre (Figure 25B). Nous avons finalement vérifié que la présence d'une plus grande concentration de DTT, suite au traitement au 2-chloroacétamide/DTT, dans un des deux échantillons n'influait pas l'activité de la caspase-3. En effet, il est recommandé par le fournisseur de la caspase-3 d'utiliser cette dernière dans un tampon contenant du DTT. Nous voulions donc vérifier que la différence dans le clivage protéolytique de PARP1 que nous avons observée n'était pas due à une concentration plus élevée de DTT dans un des deux échantillons et ainsi à une plus grande activité enzymatique. Pour ce faire, nous avons effectué l'essai à nouveau, mais cette fois sans l'utilisation de 2-chloroacétamide et de DTT et en désactivant la caspase-3 dans le premier échantillon seulement en la faisant bouillir. Nous avons, ainsi, pu observer les mêmes résultats que précédemment, soit que PARP1 est davantage clivée si la protéine est d'abord dé-SUMOylée avant d'être traitée à la caspase-3 (Figure 25C).

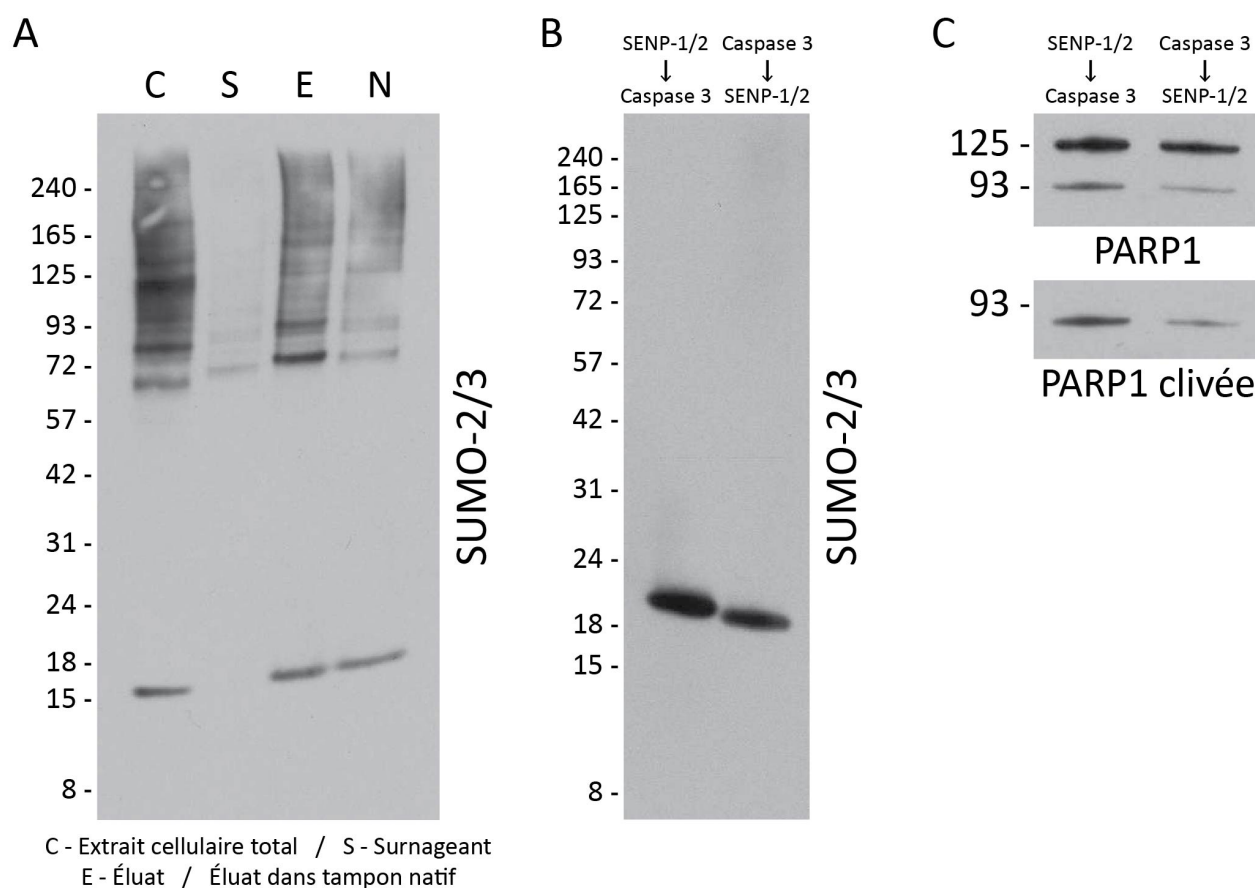


Figure 25. Vérification des conditions de l'essai caspase. (A) Immunobuvardage avec l'anticorps contre SUMO-2/3 de l'extrait cellulaire total, du surnageant, de l'éluat et de l'éluat dans un tampon natif de la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h. (B) Immunobuvardage avec l'anticorps contre SUMO-2/3 de l'éluat de la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h après l'essai caspase *in vitro*. (C) Immunobuvardage avec les anticorps contre PARP1 et PARP1 clivée de l'éluat de la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h après l'essai caspase *in vitro* sans utiliser de 2-chloroacétamide et de DTT entre les deux étapes enzymatiques.

4.15 Modèle proposé

À la lumière de l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette étude, nous avons proposé un modèle pour le rôle de la SUMOylation de PARP1 par rapport à son clivage protéolytique par la caspase-3 dans le contexte du traitement à l'ATO (Figure 26). En effet, nous avons observé une augmentation de la SUMOylation du site K203 sur PARP1 après quatre heures de traitement avec 10 μ M d'ATO, dans notre expérience de spectrométrie de masse à grande échelle. Nous avons également montré, par immunobuvardage, que PARP1 est clivée en réponse à 10 μ M d'ATO, avec des temps de traitement longs, soit à partir de 48 heures. Nous pensons donc que la SUMOylation de PARP1 en réponse à l'ATO augmente d'abord avant de diminuer. L'ATO induit un stress oxydatif dans les cellules, causant des dommages à l'ADN et la formation de corps nucléaires PML. Ces structures peuvent recruter différents partenaires d'interaction protéiques et de nombreux événements de modification post-traductionnelle s'y déroulent. En réponse à un traitement de courte durée avec l'ATO, PARP1 pourrait être SUMOylée sur sa lysine 203, empêchant ainsi son inactivation par clivage protéolytique. Ainsi, PARP1 pourrait être impliquée dans la réparation de l'ADN endommagé par le stress oxydatif. Cependant, lorsque le temps de traitement à l'ATO devient trop long, les dommages causés à l'ADN peuvent être trop importants pour être réparés. Les cellules entreraient donc dans le processus de mort cellulaire programmée. Pour ce faire, PARP1 pourrait être dé-SUMOylée afin de permettre son clivage par la caspase-3 et l'induction de l'apoptose.

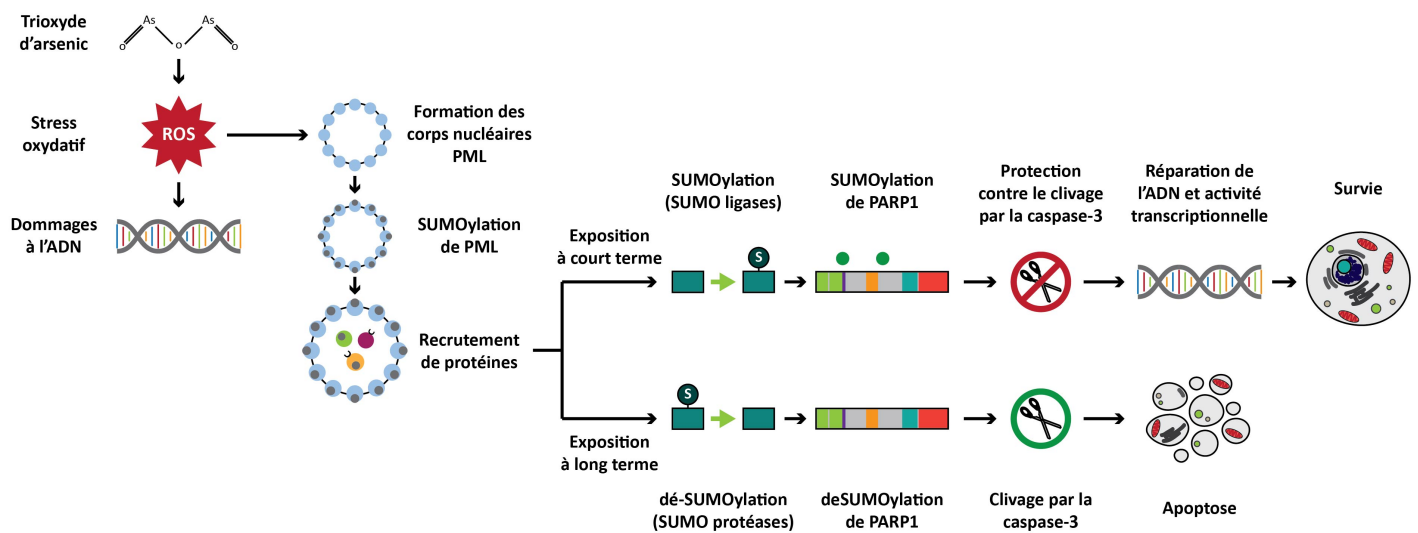


Figure 26. Modèle proposé pour le rôle de la SUMOylation de PARP1 par rapport à son clivage protéolytique par la caspase-3 dans le contexte du traitement à l'ATO. L'ATO induit des dommages à l'ADN dans les cellules. Lors d'un traitement à court terme avec l'ATO, PARP1 pourrait être SUMOylée pour assurer sa stabilisation, permettant ainsi la réparation de l'ADN et son activité transcriptionnelle. Lors d'un traitement à long terme avec l'ATO, lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants pour être réparés, PARP1 pourrait être dé-SUMOylée sur certains sites spécifiques, entraînant son clivage par la caspase-3 et l'induction de l'apoptose.

5. Discussion

Le but de ce projet de recherche était de quantifier la régulation de la SUMOylation, de la phosphorylation et de l'ubiquitination en réponse à l'ATO, un agent thérapeutique utilisé dans le traitement de la LAP. L'intérêt du projet réside dans le fait que les mécanismes moléculaires par lesquels passe l'ATO ne sont pas entièrement élucidés, et ce, même si son efficacité est reconnue pour traiter la LAP. Dans la littérature, il est rapporté que PML est SUMOylée en réponse à l'ATO et que la protéine de fusion PML/RAR α , responsable de la majorité des cas de LAP, est dégradée par l'ATO suite à sa SUMOylation et à son ubiquitination (83). À la lumière de ces informations, nous nous sommes demandé si d'autres protéines étaient régulées dans leurs modifications post-traductionnelles, en SUMOylation, mais également en phosphorylation et en ubiquitination, en réponse à l'ATO et si ces protéines pouvaient jouer un rôle dans le mécanisme d'action de l'agent thérapeutique. Nous nous sommes questionnés sur la façon dont la guérison pouvait être induite par SUMOylation afin de mieux comprendre le mécanisme d'action l'ATO et d'améliorer les connaissances générales sur les fonctions de la SUMOylation.

Dans le but de mesurer les changements de SUMOylation, de phosphorylation et d'ubiquitination, nous avons utilisé une approche en protéomique quantitative, qui permet l'enrichissement des différents peptides modifiés à partir d'un seul échantillon biologique. Ainsi, nous avons traité des cellules humaines saines, les cellules HEK293, contenant un mutant de SUMO3 (6xHis-SUMO-3-Q87R-Q88N) avec deux concentrations d'ATO, soit 1 μ M et 10 μ M, afin de faire la comparaison entre une dose faible et une dose forte. Nous avons choisi ces concentrations suite à une analyse par immunobuvardage de cellules traitées à l'ATO, en raison de la différence marquée dans la régulation de la SUMOylation en réponse aux deux concentrations. La forte dose occasionnait, en effet, une augmentation de la SUMOylation plus importante que la faible dose, sans pour autant menacer la viabilité des cellules en culture lors du traitement. Lors de cette même analyse par immunobuvardage, nous avons choisi de traiter les cellules pour une période de temps de quatre heures, le temps de traitement pour lequel nous avons observé les plus grands changements de SUMOylation,

particulièrement sur PML. À l'aide de l'expérience de spectrométrie de masse à grande échelle, nous avons pu identifier 1684 sites de modifications sur 879 protéines. Parmi ceux-ci, 204 sites sur 148 protéines ont été identifiés comme étant significativement régulés, c'est-à-dire comme étant deux fois moins ou deux fois plus abondants par rapport au contrôle. PML fait partie des protéines les plus significativement régulées. Il est rapporté dans la littérature que PML est SUMOylée et ubiquitylée en réponse à l'ATO et que la lysine SUMOylée à la position 490 est essentielle au recrutement de partenaires protéiques au sein des corps nucléaires PML (128, 129). Ainsi, le fait d'avoir observé PML comme étant SUMOylée témoigne de l'efficacité du traitement, PML agissant à titre de contrôle positif pour l'expérience.

Afin d'explorer les fonctions associées aux protéines que nous avons identifiées en spectrométrie de masse, nous avons effectué différentes analyses. Nous avons d'abord réalisé une analyse STRING qui montre que de nombreux liens unissent les protéines identifiées dans notre expérience. En effet, 86 des 148 protéines identifiées avec un site significativement régulé se trouvent dans un réseau d'interactions protéiques présentant un haut degré d'interconnectivité, signifiant que les protéines interagissent les unes avec les autres dans les cellules et qu'elles sont possiblement impliquées dans des fonctions cellulaires communes. De plus, nous avons réalisé une analyse d'ontologie génique afin de déterminer les termes GO associés aux protéines régulées de manière significative. De ce fait, nous avons pu observer qu'en plus d'être associées à de nombreux rôles classiques de la SUMOylation tels que la régulation de la transcription, les protéines sont impliquées dans la réparation de l'ADN. Nous avons trouvé cette information pertinente, puisque l'ATO induit un stress oxydatif dans les cellules, ce qui provoque des dommages à l'ADN (140). De plus, certains termes GO, par exemple celui évoquant les corps nucléaires PML, témoignent, encore une fois, de l'efficacité du traitement, ceux-ci étant connus pour se former en réponse à l'ATO.

En plus d'avoir identifié un grand nombre de protéines modifiées par SUMOylation, phosphorylation, ou ubiquitination, nous avons pu identifier certaines protéines qui étaient

régulées par plus d'une de ces modifications. À notre connaissance, aucune étude de la littérature ne rapporte la régulation de ces trois modifications simultanément dans le contexte d'un traitement à l'ATO. Ainsi, nous avons, par exemple, pu observer PML comme étant SUMOylée et ubiquitylée et SUMO1 et TRIM28 comme étant SUMOylée, ubiquitylée et phosphorylée. Ces observations suggèrent l'existence de relations unissant les différentes modifications post-traductionnelles dans le cadre d'un traitement à l'ATO. Nous avons également observé que les protéines SUMO et l'ubiquitine étaient elles-mêmes modifiées par SUMOylation et par ubiquitination, soulignant la présence d'évènements de poly-SUMOylation et de poly-ubiquitination. Cette observation est en accord avec le fait que de nombreuses protéines sont dégradées au sein des corps nucléaires PML (71).

Parmi les protéines régulées en SUMOylation, nous avons observé que certaines d'entre elles étaient des substrats connus de la caspase-3. Nous nous sommes particulièrement intéressés à PARP1, puisqu'elle est impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN (102). De plus, le site de SUMOylation que nous avons identifié sur la protéine était à proximité de son site de clivage protéolytique. Puisque les protéines SUMO sont plutôt volumineuses, nous nous sommes demandé si la SUMOylation de PARP1 sur une lysine près de son site de clivage par la caspase-3 pourrait empêcher la reconnaissance du site par la caspase-3 et ainsi inhiber son clivage protéolytique. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé un essai enzymatique *in vitro* dans lequel des protéines SUMOylées purifiées sont soit dé-SUMOylées puis traitées à la caspase-3, soit traitées à la caspase-3 puis dé-SUMOylées. Après avoir optimisé les conditions de l'essai et vérifié la compatibilité de la caspase-3 avec les tampons utilisés lors des étapes qui permettent la purification des protéines SUMOylées, nous avons appliqué l'essai à l'analyse de l'effet de la SUMOylation de PARP1 par rapport à son clivage protéolytique. Ainsi, nous avons montré que la SUMOylation de PARP1 la protégeait contre son clivage par la caspase-3 *in vitro*. En effet, nous avons pu observer que PARP1 était davantage clivée lorsqu'elle était d'abord dé-SUMOylée avant d'être traitée avec la caspase-3. Nous avons également vérifié, par immunobuvardage, que les conditions de l'essai étaient adéquates et que les résultats pour les deux échantillons étaient comparables.

Des études ont rapporté que PARP1 était clivée en réponse à l'ATO et que son clivage était nécessaire à l'induction de l'apoptose (108-110). De façon similaire, nous avons pu observer que PARP1 était clivée en réponse à 10 μ M d'ATO suite à un long temps de traitement, soit à partir de 48 heures. À l'aide de cette observation et du fait que nous avons mesuré une augmentation de la SUMOylation de PARP1 sur son site K203 en spectrométrie de masse après quatre heures de traitement à l'ATO, nous avons émis l'hypothèse que la SUMOylation de PARP1 pourrait d'abord augmenter, suite à traitement à l'ATO, avant de diminuer. Toutefois, nous avons observé, suite à une purification d'affinité au NiNTA, que la forme pleine longueur tout comme la partie clivée de PARP1 étaient enrichies et donc SUMOylées après 48 heures de traitement à l'ATO. Ceci suggère que certaines lysines sont toujours SUMOylées après ce long temps de traitement, mais il n'est pas impossible que des événements de dé-SUMOylation aient eu lieu sur la protéine à des sites spécifiques. Ainsi, l'hypothèse d'une augmentation suivie d'une diminution de la SUMOylation de PARP1 en réponse à l'ATO pourrait s'avérer juste pour quelques lysines plutôt que pour l'ensemble de la protéine. D'ailleurs, dans notre expérience à grande échelle, nous avons uniquement identifié deux sites de SUMOylation qui étaient régulés de façon significative alors que plus de 70 sites SUMOylés ont été identifiés dans la littérature (142-144).

À la lumière de ces différentes observations, nous avons imaginé un modèle qui pourrait expliquer le rôle de la SUMOylation de PARP1 dans le contexte d'un traitement à l'ATO par rapport à son clivage protéolytique par la caspase-3 et à l'induction de l'apoptose. Ainsi, l'ATO induit un stress oxydatif dans les cellules ce qui permet, d'une part, la formation des corps nucléaires PML et qui cause, d'autre part, des dommages à l'ADN (140). PARP1 qui est impliquée dans les mécanismes de réparations de l'ADN pourrait donc être SUMOylée à certains sites au sein des corps nucléaires PML en réponse à l'ATO. De cette façon, la protéine serait stabilisée et pourrait participer à la réparation de l'ADN endommagé. Cependant, si le temps de traitement à l'ATO devient trop long, les lésions de l'ADN pourraient devenir trop importantes pour pouvoir être réparées. Les cellules, afin de protéger l'organisme, entreraient alors dans le processus de mort cellulaire programmée. Toutefois, PARP1 doit être clivée pour permettre l'induction de l'apoptose. À ce moment, la protéine

pourrait donc être dé-SUMOylée sur les lysines qui avaient d'abord spécifiquement augmentée en SUMOylation afin de permettre le clivage par la caspase-3.

6. Conclusion et perspectives

Les objectifs de ce projet de recherche ont été atteints. En effet, il a été possible de quantifier les changements en SUMOylation, en phosphorylation et en ubiquitination en réponse à deux concentrations différentes d'ATO, en plus d'étudier le rôle associé à la modification d'une protéine afin d'en apprendre davantage sur le mécanisme d'action de l'ATO et sur les fonctions générales de la SUMOylation. Ainsi, nous avons pu identifier, avec trois réplicats biologiques, 521 sites SUMOylés sur 320 protéines, 1132 sites phosphorylés sur 659 protéines et 40 sites ubiquitylés sur 21 protéines en réponse à 1 μ M d'ATO. Nous avons également pu identifier 505 sites SUMOylés sur 309 protéines, 1133 sites phosphorylés sur 658 protéines et 40 sites ubiquitylés sur 21 protéines en réponse à 10 μ M d'ATO. Parmi ces sites 127 étaient significativement régulés en SUMOylation, 59 en phosphorylation et 24 en ubiquitination. De ce fait, nous avons montré que PML n'est pas la seule protéine à présenter des changements dans ses modifications post-traductionnelles en réponse à l'ATO et nous avons souligné l'existence de relations qui unissent ces différentes modifications. Ainsi, la guérison de la LAP induite par SUMOylation, en collaboration avec d'autres modifications telles que la phosphorylation et l'ubiquitination, suite à un traitement à l'ATO ne passe peut-être pas uniquement par PML. De plus, parmi les protéines identifiées dans notre expérience de spectrométrie de masse à grande échelle, nous avons remarqué que certaines de celles modifiées par SUMOylation étaient des substrats connus de la caspase-3. À la lumière de cette observation, nous avons formulé une hypothèse quant au rôle de la SUMOylation dans la protection de substrats contre leur clivage protéolytique par les caspases apoptotiques. Nous avons développé un essai enzymatique pour tester cette hypothèse et nous avons découvert que la SUMOylation de PARP1 empêchait effectivement son clivage par la caspase-3 *in vitro*.

Dans le futur, il serait intéressant de répéter les mêmes expériences de spectrométrie de masse dans des cellules leucémiques afin de vérifier si elles présentent des changements dans leurs modifications post-traductionnelles similaires à ce que nous avons obtenu. Cependant, pour ce faire, et pour conserver la méthode utilisée qui permet l'enrichissement des peptides SUMOylés à partir d'une forme exogène de SUMO3, il faudrait générer des lignées cellulaires

stables, exprimant le même mutant de SUMO3 que nous avons employé, à partir de cellules leucémiques, par exemple, à partir des cellules NB4 qui sont issues d'une patiente atteinte de la LAP et qui contiennent la protéine de fusion PML/RAR α (146). Ce processus est toutefois long et fastidieux. De plus en plus de méthodes permettant l'étude des protéines modifiées par SUMO endogène voient le jour et de telles approches pourraient alors être privilégiées (144, 147-150). Les mêmes expériences pourraient également être répétées, dans les mêmes cellules, mais avec un temps de traitement à l'ATO de 48 heures, afin de vérifier l'état de la SUMOylation de la lysine K203 de PARP1. Il serait, d'autre part, intéressant de vérifier le rôle de la SUMOylation de PARP1 par rapport à son clivage protéolytique, mais *in vivo*. Différentes techniques pourraient alors être utilisées. De la mutagenèse dirigée pourrait être réalisée sur PARP1 afin de remplacer la lysine se trouvant à proximité du site de clivage de la caspase-3 par une arginine, rendant ainsi le résidu non SUMOylable. Cependant, PARP1 est une longue protéine et ce processus pourrait s'avérer compliqué voire impossible. Des inhibiteurs de la SUMOylation globale ou des inhibiteurs de la caspase-3 pourraient alors être utilisés afin d'explorer le rôle de la SUMOylation de PARP1 sur son clivage dans des cellules (151). Il serait finalement intéressant de mesurer les niveaux d'apoptose des cellules traitées à l'ATO afin d'en déterminer le profil et l'évolution avec le temps.

Bibliographie

1. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez JM, Frankish A, Diekhans M, Harrow J, et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet.* 2014;23(22):5866-78.
2. Willyard C. New human gene tally reignites debate. *Nature.* 2018;558(7710):354-5.
3. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol.* 2003;21(3):255-61.
4. Burnett G, Kennedy EP. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem.* 1954;211(2):969-80.
5. Berndt N, Karim RM, Schonbrunn E. Advances of small molecule targeting of kinases. *Curr Opin Chem Biol.* 2017;39:126-32.
6. Fabbro D, Cowan-Jacob SW, Moebitz H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br J Pharmacol.* 2015;172(11):2675-700.
7. Ubersax JA, Ferrell JE, Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):530-41.
8. Fleuren ED, Zhang L, Wu J, Daly RJ. The kinome 'at large' in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(2):83-98.
9. Singh V, Ram M, Kumar R, Prasad R, Roy BK, Singh KK. Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J.* 2017;36(1):1-6.
10. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(1):11-5.
11. Redman KL, Rechsteiner M. Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a. *Nature.* 1989;338(6214):438-40.
12. Baker RT, Board PG. The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(5):1035-40.

13. Wiborg O, Pedersen MS, Wind A, Berglund LE, Marcker KA, Vuust J. The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J.* 1985;4(3):755-9.
14. Amerik AY, Hochstrasser M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1695(1-3):189-207.
15. Myung J, Kim KB, Crews CM. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med Res Rev.* 2001;21(4):245-73.
16. Zhao B, Bhuripanyo K, Schneider J, Zhang K, Schindelin H, Boone D, et al. Specificity of the E1-E2-E3 enzymatic cascade for ubiquitin C-terminal sequences identified by phage display. *ACS Chem Biol.* 2012;7(12):2027-35.
17. Hicke L, Schubert HL, Hill CP. Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):610-21.
18. Hoeller D, Dikic I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature.* 2009;458(7237):438-44.
19. Kwon YT, Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(11):873-86.
20. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol.* 1996;135(6 Pt 1):1457-70.
21. Mukhopadhyay D, Dasso M. Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(6):286-95.
22. Guo D, Li M, Zhang Y, Yang P, Eckenrode S, Hopkins D, et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2004;36(8):837-41.
23. Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27233-8.
24. van der Veen AG, Ploegh HL. Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:323-57.

25. Lin D, Tatham MH, Yu B, Kim S, Hay RT, Chen Y. Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21740-8.
26. Niedenthal R. Enhanced detection of in vivo SUMO conjugation by Ubc9 fusion-dependent sumoylation (UFDS). *Methods Mol Biol*. 2009;497:63-79.
27. Eifler K, Vertegaal AC. Mapping the SUMOylated landscape. *FEBS J*. 2015;282(19):3669-80.
28. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*. 2010;428(2):133-45.
29. Dasso M. Emerging roles of the SUMO pathway in mitosis. *Cell Div*. 2008;3:5.
30. Lamoliatte F, Caron D, Durette C, Mahrouche L, Maroui MA, Caron-Lizotte O, et al. Large-scale analysis of lysine SUMOylation by SUMO remnant immunoaffinity profiling. *Nat Commun*. 2014;5:5409.
31. Song J, Durrin LK, Wilkinson TA, Krontiris TG, Chen Y. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(40):14373-8.
32. Mahajan R, Gerace L, Melchior F. Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. *J Cell Biol*. 1998;140(2):259-70.
33. Yang Y, He Y, Wang X, Liang Z, He G, Zhang P, et al. Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open Biol*. 2017;7(10).
34. Venne AS, Kollipara L, Zahedi RP. The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics*. 2014;14(4-5):513-24.
35. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):45-50.
36. Kumar R, Gonzalez-Prieto R, Xiao Z, Verlaan-de Vries M, Vertegaal ACO. The STUbL RNF4 regulates protein group SUMOylation by targeting the SUMO conjugation machinery. *Nat Commun*. 2017;8(1):1809.
37. Sriramachandran AM, Dohmen RJ. SUMO-targeted ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(1):75-85.

38. Prudden J, Pebernard S, Raffa G, Slavin DA, Perry JJ, Tainer JA, et al. SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *EMBO J*. 2007;26(18):4089-101.
39. Niemi NM, MacKeigan JP. Mitochondrial phosphorylation in apoptosis: flipping the death switch. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(6):572-82.
40. Zamaraev AV, Kopeina GS, Prokhorova EA, Zhivotovsky B, Lavrik IN. Post-translational Modification of Caspases: The Other Side of Apoptosis Regulation. *Trends Cell Biol*. 2017;27(5):322-39.
41. Han ZJ, Feng YH, Gu BH, Li YM, Chen H. The post-translational modification, SUMOylation, and cancer (Review). *Int J Oncol*. 2018;52(4):1081-94.
42. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. 2012;10(2):120-36.
43. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
44. Hillestad LK. Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med Scand*. 1957;159(3):189-94.
45. Genetics Home Reference [En ligne]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2011. Acute promyelocytic leukemia [cité le 10 juil 2019]; [environ 6 écrans]. Disponible : <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/acute-promyelocytic-leukemia>.
46. Cingam SR, Koshy NV. Cancer, Acute Promyelocytic Leukemia (APL, APML). *StatPearls*. Treasure Island (FL)2019.
47. Cedar H, Bergman Y. Epigenetics of haematopoietic cell development. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(7):478-88.
48. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. 2008;111(5):2505-15.
49. Coombs CC, Tavakkoli M, Tallman MS. Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer J*. 2015;5:e304.
50. Cicconi L, Fenaux P, Kantarjian H, Tallman M, Sanz MA, Lo-Coco F. Molecular remission as a therapeutic objective in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(8):1671-8.
51. Seftel MD, Barnett MJ, Couban S, Leber B, Storrington J, Assaily W, et al. A Canadian consensus on the management of newly diagnosed and relapsed acute promyelocytic leukemia in adults. *Curr Oncol*. 2014;21(5):234-50.

52. Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Rostami S, Ghaffari SH, Jahani M, Iravani M, et al. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2753-7.
53. Mathews V, George B, Chendamarai E, Lakshmi KM, Desire S, Balasubramanian P, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up data. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3866-71.
54. Huynh TT, Sultan M, Vidovic D, Dean CA, Cruickshank BM, Lee K, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide induce lasting differentiation and demethylation of target genes in APL cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):9414.
55. de The H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V. The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *J Cell Biol*. 2012;198(1):11-21.
56. de The H, Chen Z. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(11):775-83.
57. Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, et al. A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2551-6.
58. Faber J, Armstrong SA. Mixed lineage leukemia translocations and a leukemia stem cell program. *Cancer Res*. 2007;67(18):8425-8.
59. Dos Santos GA, Kats L, Pandolfi PP. Synergy against PML-RAR α : targeting transcription, proteolysis, differentiation, and self-renewal in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med*. 2013;210(13):2793-802.
60. de The H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell*. 1991;66(4):675-84.
61. Chen SJ, Zelent A, Tong JH, Yu HQ, Wang ZY, Derre J, et al. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest*. 1993;91(5):2260-7.
62. Jensen K, Shiels C, Freemont PS. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*. 2001;20(49):7223-33.

63. Gamell C, Jan Paul P, Haupt Y, Haupt S. PML tumour suppression and beyond: therapeutic implications. *FEBS Lett.* 2014;588(16):2653-62.
64. Hsu KS, Kao HY. PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci.* 2018;8:5.
65. de The H, Riviere M, Bernhard W. Examen au microscope électronique de la tumeur VX2 du lapin domestique dérivée du papillome de Shope. *Bull Cancer.* 1960;47:570–84.
66. Lavau C, Marchio A, Fagioli M, Jansen J, Falini B, Lebon P, et al. The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene.* 1995;11(5):871-6.
67. Niwa-Kawakita M, Ferhi O, Soilihi H, Le Bras M, Lallemand-Breitenbach V, de The H. PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *J Exp Med.* 2017;214(11):3197-206.
68. Sahin U, Ferhi O, Jeanne M, Benhenda S, Berthier C, Jollivet F, et al. Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J Cell Biol.* 2014;204(6):931-45.
69. Sahin U, de The H, Lallemand-Breitenbach V. PML nuclear bodies: assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation. *Nucleus.* 2014;5(6):499-507.
70. Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi R, et al. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet.* 1998;20(3):266-72.
71. Lallemand-Breitenbach V, de The H. PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000661.
72. Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol Cell.* 2006;24(3):331-9.
73. Wang P, Benhenda S, Wu H, Lallemand-Breitenbach V, Zhen T, Jollivet F, et al. RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nat Commun.* 2018;9(1):1277.
74. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 2004;328:1-16.
75. Ablain J, de The H. Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia. *Int J Cancer.* 2014;135(10):2262-72.

76. Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:345-64.
77. Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res.* 2002;43(11):1773-808.
78. Kastner P, Lawrence HJ, Waltzinger C, Ghyselinck NB, Chambon P, Chan S. Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood.* 2001;97(5):1314-20.
79. Ito K, Bernardi R, Morotti A, Matsuoka S, Saglio G, Ikeda Y, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature.* 2008;453(7198):1072-8.
80. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Chen Z, de The H. Curing APL through PML/RARA degradation by As₂O₃. *Trends Mol Med.* 2012;18(1):36-42.
81. Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de The H. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):705-13.
82. de The H, Pandolfi PP, Chen Z. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell.* 2017;32(5):552-60.
83. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, Doubekovsky A, et al. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med.* 2001;193(12):1361-71.
84. Lengfelder E, Hofmann WK, Nowak D. Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(3):433-42.
85. Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, Yang FF, Wu ZY, Sun HB, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. *Science.* 2010;328(5975):240-3.
86. Jeanne M, Lallemand-Breitenbach V, Ferhi O, Koken M, Le Bras M, Duffort S, et al. PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As₂O₃. *Cancer Cell.* 2010;18(1):88-98.
87. Gao YH, Zhang HP, Yang SM, Yang Y, Ma YY, Zhang XY, et al. Inactivation of Akt by arsenic trioxide induces cell death via mitochondrial-mediated apoptotic signaling in SGC-7901 human gastric cancer cells. *Oncol Rep.* 2014;31(4):1645-52.

88. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
89. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* 2013;23(12):620-33.
90. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:489-517.
91. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:87.
92. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY).* 2012;4(5):330-49.
93. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008;27(48):6194-206.
94. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015;22(4):526-39.
95. Sakamaki K, Satou Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol.* 2009;74(4):727-53.
96. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999;6(11):1028-42.
97. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4).
98. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, et al. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell.* 2002;13(3):978-88.
99. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004;26(8):882-93.
100. Menissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* 2003;22(9):2255-63.
101. Briggs AG, Bent AF. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends Plant Sci.* 2011;16(7):372-80.
102. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(10):610-21.

103. Tao Z, Gao P, Liu HW. Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications. *J Am Chem Soc.* 2009;131(40):14258-60.
104. Loeffler PA, Cuneo MJ, Mueller GA, DeRose EF, Gabel SA, London RE. Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Struct Biol.* 2011;11:37.
105. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014;24(1):15-28.
106. Luo Q, Li Y, Deng J, Zhang Z. PARP-1 inhibitor sensitizes arsenic trioxide in hepatocellular carcinoma cells via abrogation of G2/M checkpoint and suppression of DNA damage repair. *Chem Biol Interact.* 2015;226:12-22.
107. Faraoni I, Giansanti M, Voso MT, Lo-Coco F, Graziani G. Targeting ADP-ribosylation by PARP inhibitors in acute myeloid leukaemia and related disorders. *Biochem Pharmacol.* 2019.
108. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem.* 1999;274(33):22932-40.
109. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(17):3976-85.
110. Kang YH, Yi MJ, Kim MJ, Park MT, Bae S, Kang CM, et al. Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res.* 2004;64(24):8960-7.
111. Durbin KR, Fornelli L, Fellers RT, Doubleday PF, Narita M, Kelleher NL. Quantitation and Identification of Thousands of Human Proteoforms below 30 kDa. *J Proteome Res.* 2016;15(3):976-82.
112. Tholey A, Becker A. Top-down proteomics for the analysis of proteolytic events - Methods, applications and perspectives. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864(11 Pt B):2191-9.

113. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR, 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev.* 2013;113(4):2343-94.
114. Chevalier F. Highlights on the capacities of "Gel-based" proteomics. *Proteome Sci.* 2010;8:23.
115. Tsiatsiani L, Heck AJ. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* 2015;282(14):2612-26.
116. Chan KC, Issaq HJ. Fractionation of peptides by strong cation-exchange liquid chromatography. *Methods Mol Biol.* 2013;1002:311-5.
117. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, et al. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science.* 1992;255(5049):1261-3.
118. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):198-207.
119. Wilm M. Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(7):M111009407.
120. Eliuk S, Makarov A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2015;8:61-80.
121. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11:49-79.
122. Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(9):699-711.
123. Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods.* 2007;4(3):207-14.
124. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(4):1017-31.
125. Beynon RJ, Pratt JM. Metabolic labeling of proteins for proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(7):857-72.
126. Meissner F, Mann M. Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. *Nat Immunol.* 2014;15(2):112-7.
127. McManus FP, Lamoliatte F, Thibault P. Identification of cross talk between SUMOylation and ubiquitylation using a sequential peptide immunopurification approach. *Nat Protoc.* 2017;12(11):2342-58.

128. Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, et al. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol.* 1999;147(2):221-34.
129. Bernardi R, Pandolfi PP. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(12):1006-16.
130. Maddika S, Ande SR, Wiechec E, Hansen LL, Wesselborg S, Los M. Akt-mediated phosphorylation of CDK2 regulates its dual role in cell cycle progression and apoptosis. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 7):979-88.
131. Jang SW, Yang SJ, Ehlen A, Dong S, Khoury H, Chen J, et al. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. *Cancer Res.* 2008;68(12):4559-70.
132. Hu Y, Yao J, Liu Z, Liu X, Fu H, Ye K. Akt phosphorylates acinus and inhibits its proteolytic cleavage, preventing chromatin condensation. *EMBO J.* 2005;24(20):3543-54.
133. Galisson F, Mahrouche L, Courcelles M, Bonneil E, Meloche S, Chelbi-Alix MK, et al. A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(2):M110 004796.
134. Matic I, Macek B, Hilger M, Walther TC, Mann M. Phosphorylation of SUMO-1 occurs in vivo and is conserved through evolution. *J Proteome Res.* 2008;7(9):4050-7.
135. Friedman JR, Fredericks WJ, Jensen DE, Speicher DW, Huang XP, Neilson EG, et al. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.* 1996;10(16):2067-78.
136. Czerwinska P, Mazurek S, Wiznerowicz M. The complexity of TRIM28 contribution to cancer. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):63.
137. Ivanov AV, Peng H, Yurchenko V, Yap KL, Negorev DG, Schultz DC, et al. PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell.* 2007;28(5):823-37.
138. Li X, Lee YK, Jeng JC, Yen Y, Schultz DC, Shih HM, et al. Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2007;282(50):36177-89.

139. Tatham MH, Geoffroy MC, Shen L, Plechanovova A, Hattersley N, Jaffray EG, et al. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):538-46.
140. Kumar S, Yedjou CG, Tchounwou PB. Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL-60) cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:42.
141. Luo Q, Li Y, Lai Y, Zhang Z. The role of NF-kappaB in PARP-inhibitor-mediated sensitization and detoxification of arsenic trioxide in hepatocellular carcinoma cells. *J Toxicol Sci.* 2015;40(3):349-63.
142. Hendriks IA, Vertegaal AC. A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(9):581-95.
143. Hendriks IA, Lyon D, Young C, Jensen LJ, Vertegaal AC, Nielsen ML. Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24(3):325-36.
144. Hendriks IA, Lyon D, Su D, Skotte NH, Daniel JA, Jensen LJ, et al. Site-specific characterization of endogenous SUMOylation across species and organs. *Nat Commun.* 2018;9(1):2456.
145. Luo J, Gurung S, Lee L, Henley JM, Wilkinson KA, Guo C. Increased SUMO-2/3-ylation mediated by SENP3 degradation is protective against cadmium-induced caspase 3-dependent cytotoxicity. *J Toxicol Sci.* 2017;42(5):529-38.
146. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood.* 1991;77(5):1080-6.
147. Zhang XD, Goeres J, Zhang H, Yen TJ, Porter AC, Matunis MJ. SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell.* 2008;29(6):729-41.
148. Cubenas-Potts C, Srikumar T, Lee C, Osula O, Subramonian D, Zhang XD, et al. Identification of SUMO-2/3-modified proteins associated with mitotic chromosomes. *Proteomics.* 2015;15(4):763-72.
149. Bruderer R, Tatham MH, Plechanovova A, Matic I, Garg AK, Hay RT. Purification and identification of endogenous polySUMO conjugates. *EMBO Rep.* 2011;12(2):142-8.

150. Becker J, Barysch SV, Karaca S, Dittner C, Hsiao HH, Berriel Diaz M, et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(4):525-31.
151. He X, Riceberg J, Soucy T, Koenig E, Minissale J, Gallery M, et al. Probing the roles of SUMOylation in cancer cell biology by using a selective SAE inhibitor. *Nat Chem Biol.* 2017;13(11):1164-71.

Annexes

Colorations au rouge de Ponceau

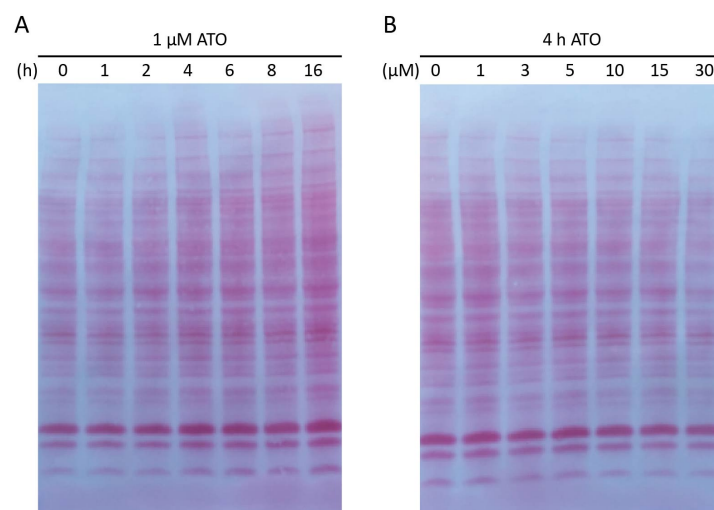


Figure 27. Coloration au rouge de Ponceau pour les immunobuvardages servant à déterminer les conditions optimales pour l'expérience de spectrométrie de masse à grande échelle.

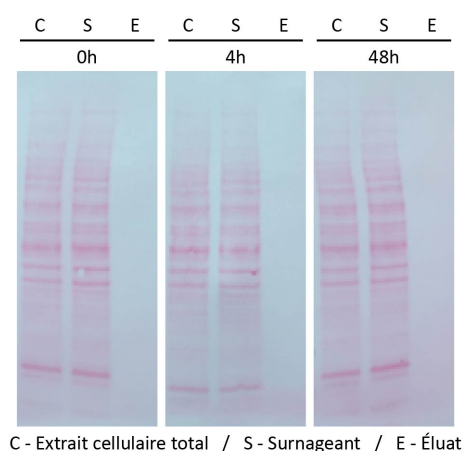


Figure 28. Coloration au rouge de Ponceau pour l'immunobuvardage correspondant à la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M d'ATO.



C - Extrait cellulaire total / S - Surnageant
E - Éluat / N - Éluat dans tampon natif

Figure 29. Coloration au rouge de Ponceau pour l'immunobuvardage correspondant à la purification d'affinité au NiNTA réalisée à partir de cellules HEK293 mutantes pour SUMO3 traitées avec 10 μ M de MG132 pendant 18h.

Sites significativement régulés

Tableau I. Sites SUMOylés significativement régulés en réponse à 1 μ M d'ATO.

Nom du gène	Résidu modifié	Position	Log ₁₀ p-value	Log ₂ FC (ATO/Contrôle)
PML	K	380	3.18	4.90
PML	K	394	2.55	3.02
PML	K	497	2.33	2.51
DNAJA3	K	126	3.25	2.22
MTA3	K	510	1.62	1.09
PML	K	490	2.43	1.01
RGPD1	K	1601	2.83	-1.04

Tableau II. Sites phosphorylés significativement régulés en réponse à 1 μ M d'ATO.

Nom du gène	Résidu modifié	Position	Log ₁₀ p-value	Log ₂ FC (ATO/Contrôle)
PDHA1	S	262	1.43	-1.04
BCKDHA	S	347	1.69	-1.10
SMARCA4	S	1349	1.46	-1.16
PDHA1	S	269	1.50	-2.47

Tableau III. Sites ubiquitylés significativement régulés en réponse à 1 μ M d'ATO.

Nom du gène	Résidu modifié	Position	Log ₁₀ p-value	Log ₂ FC (ATO/Contrôle)
PML	K	394	3.02	5.02
PML	K	401	2.33	3.89
PML	K	337	2.03	3.57
SUMO1	K	46	1.71	1.60
SUMO3	K	41	2.49	1.36
SUMO2	K	7	1.67	1.32
SUMO3	K	7	1.50	1.26

SUMO2	K	5	1.76	1.21
SUMO3	K	5	2.14	1.18
UBA52	K	63	2.07	1.02
SUMO3	K	32	2.22	1.02

Tableau IV. Sites SUMOylés significativement régulés en réponse à 10 μ M d'ATO.

Nom du gène	Résidu modifié	Position	Log₁₀ p-value	Log₂FC (ATO/Contrôle)
PML	K	380	3.61	5.12
PML	K	394	2.84	4.89
ZC3H11A	K	381	2.08	3.70
NONO	K	198	2.00	3.20
DNAJA3	K	126	2.75	3.11
ZC3H11A	K	478	2.03	2.96
YY1AP1	K	421	2.10	2.95
PML	K	497	2.18	2.88
INTS9	K	34	3.52	2.84
WHSC1	K	352	4.89	2.69
INTS12	K	68	3.02	2.68
PIAS1	K	238	2.54	2.52
YY1	K	286	1.83	2.52
PARP1	K	512	2.05	2.43
WHSC1L1	K	537	3.80	2.41
MKI67	K	2009	2.25	2.39
SCML2	K	13	1.74	2.38
NACC1	K	167	2.70	2.34
MSL2	K	301	1.62	2.33
YY1	K	288	2.95	2.32
MTA3	K	510	2.64	2.25
BCORL1	K	1092	2.28	2.23
SCML2	K	252	2.16	2.11
ZMYM4	K	1326	1.67	2.10
XPC	K	330	3.09	2.09
SKIL	K	407	1.69	2.07

EHMT1	K	234	2.10	2.03
CIZ1	K	604	2.50	2.03
ZMYM2	K	98	2.37	2.03
PARP1	K	203	3.85	2.02
SCML2	K	605	2.61	1.93
EHMT1	K	644	1.94	1.91
SUMO2	K	5	2.31	1.90
TRIM33	K	769	2.25	1.90
SUMO2	K	11	2.08	1.87
HSF2	K	139	2.66	1.76
SETDB1	K	1032	3.42	1.73
ATRX	K	1982	1.81	1.72
MKI67	K	2492	1.52	1.67
ZBTB34	K	235	2.58	1.66
SUMO1	K	37	1.82	1.66
ZNF451	K	845	2.52	1.65
ATRX	K	299	2.04	1.64
SUMO1	K	39	2.06	1.63
TP53	K	189	2.74	1.62
SUMO1	K	46	2.68	1.62
ZMYM2	K	88	2.44	1.61
PCNA	K	164	3.52	1.60
HNRNPM	K	145	2.35	1.57
PML	K	490	3.04	1.56
NAB1	K	451	1.90	1.56
PIAS2	K	249	1.34	1.56
CHD9	K	2843	2.11	1.55
ZBTB33	K	611	2.06	1.55
ATRX	K	438	1.88	1.55
SUMO3	K	5	1.56	1.51
SUMO1	K	25	1.64	1.51
SUMO2	K	7	1.67	1.50
INTS4	K	791	2.33	1.47
TRIM33	K	793	1.69	1.45
SRBD1	K	134	2.96	1.44

LIN37	K	7	1.87	1.42
ZBTB46	K	229	1.53	1.41
ZNF644	K	718	2.68	1.40
GSE1	K	520	1.62	1.37
SRBD1	K	185	3.13	1.36
HOMEZ	K	182	1.32	1.36
SCML2	K	536	1.65	1.30
PCNA	K	254	1.32	1.29
GDI1	K	269	1.55	1.28
SUMO1	K	7	2.29	1.28
MECOM	K	721	1.64	1.27
ZNF462	K	2504	2.09	1.26
KIF23	K	403	1.47	1.26
ZMYM2	K	441	2.96	1.24
UBA52	K	11	2.51	1.23
HSF2	K	82	2.42	1.21
SUMO3	K	11	1.89	1.09
XPC	K	81	2.68	1.07
MSH3	K	187	2.35	1.02
BRMS1L	K	192	1.55	-1.01
SAP130	K	434	1.90	-1.01
ZNF106	K	965	1.90	-1.02
RCOR1	K	294	1.44	-1.03
HIST2H2BF	K	6	1.41	-1.05
PHIP	K	1470	1.50	-1.07
CCNL1	K	362	1.55	-1.09
GINS2	K	109	1.71	-1.10
ZFP1	K	90	1.39	-1.10
SAFB2	K	293	2.26	-1.11
BAZ1B	K	1085	2.27	-1.11
BRMS1L	K	198	1.82	-1.12
ZNF518A	K	1446	1.35	-1.14
MED7	K	185	1.57	-1.14
RLF	K	1599	1.66	-1.20
TRIM24	K	689	1.60	-1.22

DPF3	K	99	2.70	-1.23
SIN3A	K	563	1.97	-1.25
USP39	K	51	1.36	-1.27
RSF1	K	2	1.98	-1.28
SF3A2	K	103	1.32	-1.29
MAF	K	33	3.10	-1.30
SAFB2	K	230	1.47	-1.31
SART1	K	141	1.82	-1.32
MSANTD2	K	38	2.50	-1.35
SAFB2	K	350	2.43	-1.37
ACIN1	K	315	2.40	-1.37
ACIN1	K	305	2.06	-1.38
EHMT1	K	528	2.33	-1.41
TRRAP	K	2525	1.76	-1.42
PRPF4B	K	117	1.69	-1.44
SAFB2	K	252	1.53	-1.48
SAP30	K	214	2.37	-1.52
KDM5B	K	278	1.80	-1.55
ARID4B	K	110	1.57	-1.56
USP7	K	853	1.74	-1.57
ESRRA	K	402	2.71	-1.60
SMARCC2	K	735	1.95	-1.62
CCAR1	K	997	1.86	-1.62
PBRM1	K	1293	1.52	-1.64
ZMYND8	K	12	2.06	-1.64
KDM5B	K	242	2.23	-1.65
BRD8	K	375	1.63	-1.66
SUPT7L	K	136	3.06	-1.75
TDG	K	330	2.13	-2.49
PBRM1	K	1398	2.98	-2.76

Tableau V. Sites phosphorylés significativement régulés en réponse à 10 μ M d'ATO.

Nom du gène	Résidu modifié	Position	Log₁₀ p-value	Log₂FC (ATO/Contrôle)
STIM1	S	257	2.39	2.12
NASP	S	357	2.08	2.02
RPLP2	S	102	2.02	1.98
SRRM1	S	431	2.72	1.90
NCAM1	S	774	2.71	1.87
VIM	S	430	2.03	1.78
WDHD1	S	244	2.35	1.60
SRRM2	S	1233	1.88	1.60
HUWE1	S	1368	2.97	1.52
MCM6	S	762	2.73	1.49
SRRM2	S	1987	2.25	1.30
SMC1A	S	360	1.46	1.28
SMARCAD1	S	152	1.55	1.23
PRRC2C	S	2105	1.53	1.19
TRIM28	S	391	1.87	1.17
MAP4	S	507	1.79	1.15
ZC3H11A	S	108	1.42	1.14
SRRM2	S	1916	4.55	1.10
SRRM2	S	387	1.64	1.05
TMEM192	S	226	1.84	1.05
TP53BP1	S	1068	2.60	1.04
SCAMP3	S	50	1.39	1.02
UTP14A	S	393	3.43	1.01
PFKL	S	775	1.73	1.01
LMNA	S	406	2.18	-1.01
NDRG1	S	249	1.75	-1.01
NOC2L	S	49	2.06	-1.02
NEFM	S	30	1.53	-1.03
GTF3C2	S	167	1.71	-1.04
DDX23	S	107	1.74	-1.05
CLN6	S	31	2.58	-1.09

KHDRBS1	S	20	2.40	-1.11
SF3B1	T	223	1.89	-1.16
SF3B1	T	227	1.89	-1.16
TMPO	S	156	1.78	-1.17
ANLN	S	485	1.37	-1.18
SH3KBP1	S	193	1.99	-1.18
DDX17	S	520	2.16	-1.19
LMNA	S	404	1.50	-1.20
HIST1H1E	T	18	1.48	-1.22
RIF1	S	2196	1.40	-1.24
LMNA	S	407	1.82	-1.29
GRK6	S	484	2.14	-1.31
TBC1D4	S	341	3.19	-1.34
DDX21	S	71	1.78	-1.36
KIF4A	S	801	2.03	-1.38
VWA7	S	461	1.87	-1.42
PDCD4	S	446	1.87	-1.44
TCOF1	S	1312	2.22	-1.47
SSRP1	S	659	2.48	-1.74
SCAF1	S	874	2.68	-1.75
PDCD4	S	65	2.34	-1.76
MAPK1	T	185	1.43	-2.17
MAPK1	Y	187	1.43	-2.17
BCKDHA	S	347	1.82	-2.36
SMARCA4	S	1349	2.31	-2.46
PDHA1	S	262	3.14	-2.51
SAFB	S	535	2.36	-2.57
PDHA1	S	269	1.74	-3.69

Tableau VI. Sites ubiquitylés significativement régulés en réponse à 10 μ M d'ATO.

Nom du gène	Résidu modifié	Position	Log ₁₀ p-value	Log ₂ FC (ATO/Contrôle)
PML	K	394	3.22	3.86
NONO	K	249	3.22	3.35

PML	K	401	1.77	3.06
PML	K	337	1.75	2.92
NONO	K	198	2.08	2.32
NONO	K	107	2.31	2.28
AMOT	K	496	1.93	1.69
SUMO2	K	7	1.45	1.62
SUMO2	K	5	1.68	1.61
SUMO3	K	5	1.40	1.49
SUMO3	K	7	1.48	1.46
UBA52	K	63	2.00	1.28
UBA52	K	48	2.13	1.25
SUMO1	K	46	1.72	1.22
AMOT	K	231	1.45	1.14
SUMO3	K	32	2.00	1.09
H2AFX	K	120	2.11	-1.05
ZNF280C	K	564	1.32	-1.35
ZNF280C	K	574	2.13	-1.38
USP22	K	405	1.86	-1.39
H2AFV	K	121	1.93	-1.41
HIST2H2BE	K	121	2.27	-2.06
H2BFS	K	121	2.49	-2.06